



Micro-irradiation ciblée par faisceau d'ions pour la radiobiologie in vitro et in vivo

François Vianna

► To cite this version:

François Vianna. Micro-irradiation ciblée par faisceau d'ions pour la radiobiologie in vitro et in vivo. Physique Nucléaire Expérimentale [nucl-ex]. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0030 . tel-01127346

HAL Id: tel-01127346

<https://theses.hal.science/tel-01127346>

Submitted on 7 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

SPÉCIALITÉ : Astrophysique, plasmas, nucléaire

Par François VIANNA

**MICRO-IRRADIATION CIBLÉE PAR FAISCEAU D'IONS
POUR LA RADIOBIOLOGIE *IN VITRO* ET *IN VIVO***

Directeur de thèse : M. Philippe MORETTO
Co-directeur de thèse : M. Philippe BARBERET

Soutenue le 26 mars 2014

Membres du jury :

M. GOBET, Franck
M. BEUVE, Michaël
M. BRASSE, David
Mme ROY, Laurence
M. GRESSIER, Vincent

Professeur, Université de Bordeaux
Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1
Directeur de recherches, CNRS
Ingénieur-Chercheur, IRSN
Ingénieur-Chercheur, IRSN

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur

Laboratoire d'accueil



Centre d'Études Nucléaires de Bordeaux-Gradignan – CENBG
UMR 5797 (CNRS / IN2P3 – Université de Bordeaux)

Chemin du Solarium
BP120
33175 GRADIGNAN CEDEX
FRANCE

À mon père...

À ma famille...

« Sans imagination il ne pourrait y avoir création. »

Albert Jacquard

*« Le véritable voyage de découverte ne consiste pas à chercher de nouveaux paysages, mais à avoir
de nouveaux yeux. »*

Marcel Proust

Remerciements

Un grand nombre de personnes ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse. Ces quelques lignes sont là pour leur exprimer toute ma gratitude.

Je tiens tout d'abord à remercier Bernard Haas et Philippe Moretto, respectivement ancien et actuel directeurs du CENBG, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail. Merci à Monsieur Franck Gobet pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse et examiné ce travail, Messieurs Michaël Beuve et David Brasse pour avoir accepté d'en être les rapporteurs, Madame Laurence Roy et Monsieur Vincent Gressier d'avoir accepté d'examiner ce travail.

À l'ensemble du groupe IPCV dans lequel j'ai eu plaisir à évoluer durant ces années, j'exprime mes remerciements sincères. En premier lieu, je suis profondément reconnaissant envers Philippe Moretto, cette fois-ci en tant qu'ancien responsable du groupe et directeur de thèse, pour, il y a quelques années, avoir cru en moi et m'avoir accueilli lors de mon premier stage de licence, qui m'a donné goût au travail à l'interface physique – biologie. Cette première expérience, ainsi que son soutien constant au cours des années qui ont suivi, m'ont été très précieux et je n'en serais pas là sans lui. Merci. Je remercie bien sûr mon co-directeur de thèse, Philippe Barberet, pour sa patience, son soutien, et son encadrement au cours de ce travail. Sa pédagogie et son calme m'ont grandement aidé à avancer, et à tenir le cap dans les moments difficiles. Je remercie également Hervé Seznec, responsable actuel du groupe IPCV, pour son accueil au sein de l'équipe, ses nombreuses et précieuses explications qui m'ont permis d'appréhender les aspects biologiques de ce travail sous un éclairage différent, ainsi que pour son soutien.

Ce travail n'aurait pas été possible sans la présence de mon binôme, Stéphane Bourret, avec qui j'ai partagé ces trois ans. Sa présence et notre collaboration durant ces années ont grandement contribué au contenu de cette thèse. Son aide tout au long de nos travaux communs aura été énormément appréciée. Merci Stéphane, et bon courage pour la suite.

Je remercie également les autres membres du groupe IPCV avec qui j'ai pu interagir, pour leur accueil et leur gentillesse : Sébastien Incerti, Claire Michelet, Guillaume Devès, Richard Ortega, Asunción Carmona, Stéphane Roudeau. Merci à mes confrères (ex-)doctorants, Mathieu Karamitros pour les nombreux échanges dans et hors du cadre du labo et Quentin Le Tréquesser pour sa bonne humeur et son enthousiasme permanents. Merci à Gladys Saez pour son fort soutien et pour le bol de bonbons toujours à portée de main sur son bureau. À la « petite dernière » doctorante arrivée dans l'équipe, Giovanna Muggiolu, je souhaite bonne continuation dans ses aventures scientifiques.

Je tiens aussi à remercier les membres du service administration du CENBG, notamment Nathalie Favret pour son efficacité et sa gentillesse. Un grand merci également à tous les membres du service instrumentation et détecteurs et de la plate-forme AIFIRA, pour leur aide précieuse pendant les mises au point et les expériences sur la ligne microfaisceau. Je remercie particulièrement Laurent Sérani, Laurent Daudin, Gérard Claverie, Sébastien Leblanc, Virginie Bottollier, Philippe Alfaut et Stéphanie Sorieul. Je remercie aussi les membres du service mécanique, en particulier Franck Delalée, Mathieu Roche et Soufiane El Abbeir.

Enfin, j'étends ma profonde gratitude à l'ensemble du personnel du CENBG avec qui j'ai pu interagir et qui ont, de près ou de loin, contribué à ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire pour le soutien financier à ce travail, ainsi que pour l'opportunité offerte de poursuivre mon chemin en son sein. D'abord un énorme merci à Vincent Gressier, mon tuteur IRSN, pour son aide et son soutien tout au long de ces trois années. Merci également à Jean-François Bottollier-Depois, chef du SDE, Jean-Marc Such, chef du LMDN, et Sandrine Nicolas, secrétaire du LMDN, pour leur soutien et leur aide à tous les niveaux. Je remercie plus globalement l'ensemble des membres du LMDN pour leur accueil chaleureux lors de mes visites à Cadarache. Merci par ailleurs à Gauzelin Barbier et Margot Tirmarche de la DSDP pour leur suivi de ce travail de thèse

À vous tous, les amis, qui m'avez soutenu et supporté, même dans mes phases « bougonnes », je n'ai pas de mots pour exprimer à quel point votre présence m'a été précieuse. Vous m'avez permis de tenir le cap dans des moments parfois difficiles et avez fortement contribué à ce que je suis aujourd'hui. Merci donc à Stéphanie et Bastien, Esther, Line, Aurélie et Pierre-Henri, Estelle et Benoît, Aude, Claire, Nathalie, Marie, Audrey, Hélène V., Thomas, Laura et David B., Laure et Clément, Florie et Olivier B., Romuald, Christophe, Amandine, Rebecca, Marjorie, Hélène J., Omar, Mana et Jérémie, Vincent, Isabelle et Olivier D. et, enfin, un gros merci à David L.

Je tiens à remercier également Micheline, Christian, Cécile et Béatrice Blidon pour leur présence et leur soutien depuis de nombreuses années.

Je remercie toute ma famille, qui m'a encouragé, soutenu et a supporté mon sale caractère durant toutes ces années. Un énorme MERCI donc à ma mère, Colette, à mon beau-père, Joël, à mes frères et leurs moitiés, Paul et Marie-Laure, Benoît et Stéphanie. Je leur dédie cette thèse.

Je terminerai en ayant une pensée affectueuse pour ceux qui sont partis trop tôt, mais qui ne m'ont jamais vraiment quitté durant mon parcours : mes grands-parents maternels et paternels, et bien évidemment mon père, Michel, à qui je dédie tout particulièrement cette thèse.

Table des matières

INTRODUCTION	15
CONTEXTE & ENJEUX	21
1. Radiobiologie : quelques définitions	23
2. Les particules chargées en radiobiologie expérimentale	24
3. Les microfaisceaux de particules chargées pour la radiobiologie	26
3.1. Étude des faibles doses.....	26
3.2. Étude de l'effet de proximité.....	27
3.3. Micro-irradiation et études à l'échelle de l'ADN	28
3.3.1. L'impact des rayonnements ionisants sur la molécule d'ADN.....	28
3.3.2. Études des mécanismes de détection et de réparation des dommages ADN par microfaisceau	31
3.4. Du cellulaire au multicellulaire	32
4. Micro-irradiation et dosimétrie	34
4.1. Les outils de la modélisation.....	35
4.2. Évaluation de la dose à l'échelle cellulaire	35
5. Le microfaisceau d'ions du CENBG.....	37
5.1. Historique et caractéristiques	37
5.2. Évolutions du dispositif.....	40
6. Installation d'un microfaisceau d'ions sur l'installation AMANDE de l'IRSN	41
MATÉRIEL & MÉTHODES.....	43
A – DÉVELOPPEMENT TECHNIQUE D'UNE LIGNE DE MICRO-IRRADIATION PAR FAISCEAU D'IONS	45
1. Le microfaisceau d'ions pour l'irradiation	47
1.1. Description générale du dispositif.....	47
1.1.1. La plate-forme AIFIRA	47
1.1.2. La ligne de micro-irradiation.....	49
1.1.3. L'étage terminal	50
1.1.4. Le puits de culture	52
1.2. Contrôle-commande des instruments.....	53
1.2.1. Faisceau d'ions	54
1.2.2. Platines motorisées.....	55
1.2.3. Système de microscopie.....	55
2. Le logiciel Micro-Irradiation Application.....	55
2.1. Architecture générale.....	56
2.2. Contrôle des instruments	56

2.2.1.	Faisceau	56
2.2.2.	Caméra	56
2.2.3.	Microscope	57
2.2.4.	Porte-échantillon.....	57
2.3.	Procédures.....	57
2.3.1.	Caractérisation du faisceau	57
2.3.2.	Traitement d'images et reconnaissance automatique de formes.....	58
2.3.3.	Étalonnage du système.....	59
2.3.4.	Étalonnage et précision de tir.....	60
2.4.	Irradiation d'échantillons	61
2.4.1.	Irradiation en réseau	62
2.4.2.	Irradiation ciblée d'un champ microscope	62
2.4.3.	Irradiation de plusieurs champs	62
2.5.	Vidéomicroscopie en ligne	63
3.	Développement de systèmes de détection des ions délivrés.....	63
3.1.	Détection en aval de l'échantillon	64
3.2.	Détection en amont de l'échantillon	65
3.2.1.	Détecteur à scintillation	66
3.2.2.	Détecteur d'électrons secondaires	67
3.2.3.	Mesure de l'efficacité de détection	68
4.	Caractérisation du faisceau : Irradiation de détecteurs solides de traces.....	68
B –	IRRADIATION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES VIVANTS	71
1.	Irradiation de cellules et immunodétection	73
1.1.	Préparation des cellules pour l'irradiation	73
1.2.	Irradiation.....	74
1.2.1.	Irradiation en réseau	75
1.2.2.	Irradiation ciblée.....	75
1.3.	Immunodétection	75
2.	Micro-irradiation à l'échelle cellulaire et vidéomicroscopie.....	76
2.1.	Les protéines d'intérêt.....	76
2.2.	Protocole d'irradiation et de vidéomicroscopie.....	78
2.2.1.	Visualisation, sélection et ciblage	78
2.2.2.	Irradiation et vidéomicroscopie.....	78
3.	Micro-irradiation d'un organisme multicellulaire : <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	79
3.1.	Les lignées de <i>C. elegans</i> utilisées.....	79
3.2.	Préparation des puits de culture	80
3.3.	Protocole d'irradiation et de vidéomicroscopie.....	82

3.3.1.	Visualisation	83
3.3.2.	Sélection des embryons et des cibles à irradier	83
3.3.3.	Irradiation et vidéomicroscopie	83
4.	Analyse des données.....	84
4.1.	Mesure de l'évolution de la fluorescence à l'échelle cellulaire	84
4.2.	Mesure du mouvement de noyaux cellulaires d'un embryon précoce de <i>C. elegans</i> ..	87
C –	MICRODOSIMÉTRIE DE L'IRRADIATION PAR FAISCEAU D'IONS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE ET	
MULTICELLULAIRE.....		89
1.	Microdosimétrie sur un modèle cellulaire réaliste.....	91
1.1.	Le modèle cellulaire	91
1.1.1.	Géométrie	91
1.1.2.	Composition chimique	92
1.2.	Processus physiques.....	94
1.3.	Modélisation du dispositif d'irradiation.....	94
1.4.	Données obtenues	95
2.	Dosimétrie de l'irradiation d'un embryon précoce de <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	96
2.1.	Modélisation de l'embryon de <i>C. elegans</i>	96
2.2.	Processus physiques.....	96
2.3.	Modélisation du dispositif d'irradiation.....	96
2.4.	Données obtenues	97
RÉSULTATS		99
D –	PERFORMANCES DE LA LIGNE DE MICRO-IRRADIATION.....	101
1.	Caractérisation du dispositif	103
1.1.	Positionnements électrostatique et mécanique.....	103
1.2.	Taille de faisceau.....	104
2.	Irradiation en réseau d'une population cellulaire	105
3.	Irradiation ciblée et précision de tir.....	108
3.1.	Évaluation de la précision de tir sur détecteur de traces.....	108
3.2.	Évaluation de la précision de tir par immunomarquage de noyaux cellulaires	109
3.3.	Mesure de la précision de tir par vidéomicroscopie en ligne.....	110
4.	Contrôle du nombre de particules déposées	111
4.1.	Détecteur à scintillation	112
4.2.	Détecteur d'électrons secondaires	114
E –	IRRADIATION DE NOYAUX CELLULAIRES ET VIDÉOMICROSCOPIE.....	117
1.	Modélisation de l'irradiation par microfaisceau d'ions à l'échelle cellulaire.....	119

2. Visualisation en temps réel de la formation de dommages ADN radio-induits à l'échelle cellulaire	122
2.1. Visualisation en temps réel de la relocalisation de la protéine XRCC1	122
2.2. Étude de la cinétique de relocalisation de la protéine XRCC1	124
2.3. Étude de la corrélation entre le dépôt de dose obtenu par modélisation numérique et les effets biologiques observés	128
2.3.1. Taille du dépôt d'énergie et spot de relocalisation de XRCC1	128
2.3.2. Corrélation dose locale déposée / effet biologique	130
3. Visualisation en temps réel de la formation de dommages ADN indirects radio-induits à l'échelle cellulaire	132
3.1. Génération et visualisation en temps réel de dommages ADN indirects suite à l'irradiation par microfaisceau d'ions	133
3.2. Étude de la cinétique de relocalisation de la protéine OGG1	135
3.3. Relocalisation de OGG1 et réparation des dommages	136
F – IRRADIATION D'UN ORGANISME MULTICELLULAIRE : EMBRYONS PRÉCOCES DE <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	139
1. Modélisation de l'irradiation par faisceau d'ions d'un embryon précoce de <i>C. elegans</i>	141
2. Visualisation en temps réel des conséquences de l'irradiation par faisceau d'ions à l'échelle multicellulaire chez le nématode <i>C. elegans</i>	144
2.1. Suivi des divisions cellulaires chez un embryon précoce de <i>C. elegans</i>	144
2.2. Micro-irradiation d'embryons MG152	145
2.3. Visualisation des dommages ADN radio-induits : Micro-irradiation d'embryons WS1433	146
2.4. Irradiation en fonction du cycle cellulaire : Micro-irradiation d'embryons GZ264	147
3. Étude de l'impact des rayonnements ionisants sur la division des cellules embryonnaires : Mesure du temps de division des cellules embryonnaires	149
4. Visualisation et irradiation d'embryons précoces de <i>C. elegans</i> en multi-fluorescence : la lignée SA250	151
DISCUSSION & PERSPECTIVES	155
1. Une ligne de faisceau opérationnelle pour l'irradiation d'échantillons biologiques vivants	157
2. Génération de dommages ADN radio-induits et vidéomicroscopie en ligne : de l'échelle cellulaire à l'échelle multicellulaire	158
3. Premières applications en radiobiologie	160

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	163
-----------------------------------------	------------

INTRODUCTION

L'interdisciplinarité est un enjeu de poids pour le développement actuel de la recherche. À ce titre, le Centre d'Études Nucléaires de Bordeaux-Gradignan (CENBG), unité mixte de recherche de l'Institut National de Physique Nucléaire et de Physique des Particules (IN2P3), institut du CNRS, et de l'Université de Bordeaux, dispose d'une dizaine de groupes de recherches et services techniques dont les domaines d'étude sont d'une variété assez rare dans un laboratoire de ce type. Ainsi, ses thématiques vont de la recherche en physique nucléaire et des particules, aux applications de la physique subatomique à différents sujets multidisciplinaires répondant à des enjeux de société, telle l'étude et l'exploitation des rayonnements ionisants pour les sciences du vivant. C'est dans ce cadre que s'inscrit la problématique de cette thèse, effectuée au sein du groupe de recherche Interface Physique-Chimie pour le Vivant (IPCV), équipe interdisciplinaire composée de physiciens, de chimistes et de biologistes travaillant ensemble. Ses thèmes de recherche sont doubles et concernent l'utilisation des rayonnements ionisants pour sonder la matière vivante, et la compréhension de l'interaction rayonnements ionisants – vivant.

Depuis son origine, le vivant est continuellement exposé aux rayonnements ionisants. Dans un premier temps d'origine naturelle, liés à la radioactivité naturelle ou aux rayonnements cosmiques, ils sont à notre époque de plus en plus liés à l'activité humaine. En effet, de nombreux domaines utilisent les rayonnements ionisants, que ce soit dans l'industrie, par exemple en agro-alimentaire avec la stérilisation des aliments par irradiation, dans le domaine de la production d'énergie avec la conception et l'exploitation de centrales nucléaires, ou encore dans le domaine militaire pour l'armement. Le domaine médical utilise également les rayonnements ionisants, pour le diagnostic avec les techniques de radiographie, de scanner ou de scintigraphie, ou pour la thérapeutique, pour le traitement du cancer par radiothérapie conventionnelle, ou par les nouvelles techniques de protonthérapie, d'hadronthérapie et de radio-immunothérapie. La radioprotection des travailleurs du nucléaire et du grand public contre les effets néfastes des rayonnements, ainsi que la mise en place de traitements efficaces et sûrs nécessite une compréhension la plus exhaustive possible des effets des rayonnements ionisants sur le vivant.

Afin d'étudier les conséquences de l'exposition du vivant à de faibles doses de rayonnements ionisants, l'équipe IPCV s'est équipée, au début des années 2000, d'un outil permettant de réaliser des irradiations ciblées à dose contrôlée d'échantillons biologiques vivants par microfaisceau d'ions. Les expériences réalisées sur cet instrument, mis en place sur la plate-forme AIFIRA (Applications des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine) lors de sa mise en service en 2006, ont permis de montrer sa capacité à irradier sélectivement un compartiment subcellulaire en dose contrôlée (mode ion par ion) à l'échelle de la cellule unique. Afin de résoudre certaines limites posées par ce premier système, et pour y apporter de nouvelles fonctionnalités permettant de sonder de manière plus fine les effets des rayonnements ionisants sur le vivant, la création d'une

nouvelle version du dispositif d'irradiation a été décidée et sa conception et sa mise en place ont débuté en 2010. Ce travail de thèse a donc porté sur cette nouvelle ligne d'irradiation ciblée d'échantillons biologiques vivants par microfaisceau d'ions.

Par ailleurs, cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le CENBG et l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN). Si le traitement de certains cancers par radiothérapie a fait la preuve de son efficacité, un certain nombre d'effets secondaires liés à l'irradiation des tissus sains environnant le tissu tumoral peuvent apparaître. Ces effets secondaires peuvent rester bénins, mais sont également susceptibles d'affecter durablement la qualité de vie des patients, voire d'entraîner l'apparition de cancers secondaires. Il subsiste de plus un risque lié au surdosage, comme cela a malheureusement été illustré récemment dans l'actualité avec les affaires des patients surirradiés des hôpitaux d'Épinal et de Toulouse. Dans ce cadre, l'IRSN a mis en place le programme de recherche ROSIRIS afin de mieux connaître les mécanismes à l'origine des effets secondaires des radiothérapies, et ainsi s'en prémunir. En complément des outils à sa disposition, l'institut a identifié le besoin de s'équiper d'un outil pour sonder les dommages ADN radio-induits à l'échelle cellulaire et les mécanismes de communication intra- et intercellulaires associés. L'utilisation de microfaisceaux d'ions constituant alors un atout important, l'IRSN s'est rapproché du CENBG pour tirer parti de son expertise dans ce domaine et une collaboration s'est mise en place pour construire un dispositif similaire à celui présent sur la plate-forme AIFIRA sur l'installation AMANDE (Accélérateur pour la Métrologie et les Applications des Neutrons en Dosimétrie Externe) de l'IRSN située sur le site de Cadarache (Bouches du Rhône).

Il est important de noter que ces travaux n'auraient pas été possibles sans une interaction constante avec les biologistes du groupe, plus particulièrement avec Stéphane Bourret, en thèse de biologie, pour la mise en place des différents protocoles. Effectué intégralement au CENBG, le travail réalisé au cours de ces trois années a porté sur différents points :

- la **mise en service et la caractérisation de la nouvelle ligne de faisceau d'ions pour l'irradiation** sur la plate-forme AIFIRA, ainsi que sa **validation pour l'irradiation d'échantillons biologiques vivants** ;
- le **développement technique et la caractérisation de deux systèmes de détection** des ions permettant le contrôle absolu du nombre de particules délivrées au sein des échantillons ;
- la mise en place de protocoles pour réaliser **l'irradiation spécifique d'un compartiment subcellulaire défini aux échelles cellulaire et multicellulaire, *in vitro* et *in vivo***, ainsi que le **suivi des conséquences des dommages ADN radio-induits** ;

-
- la **modélisation de ces irradiations avec l'outil de simulation Monte-Carlo Geant4** pour calculer les caractéristiques physiques, comme l'énergie déposée dans les échantillons irradiés et la dose associée, et interpréter les observables biologiques au regard de ces données physiques.

Après quelques brefs rappels sur les mécanismes et les grandeurs physiques mis en jeu, la première partie de ce manuscrit exposera le contexte et les enjeux ayant amené au développement d'une nouvelle version du dispositif de micro-irradiation par faisceau d'ions du CENBG.

La deuxième partie sera consacrée à la présentation des différentes techniques mises en œuvre pour mener à bien ces travaux, à savoir : A) une présentation de la plate-forme AIFIRA, du principe général de la ligne de micro-irradiation, ainsi que de son instrumentation et de son contrôle commande, avec un accent sur les systèmes de détection des ions ; B) les techniques de biologie employées pour caractériser le dispositif, ainsi que les échantillons et les différents marqueurs étudiés pour la mise en place des protocoles d'irradiation et de suivi ; C) les outils utilisés pour modéliser numériquement l'irradiation afin de caractériser le dépôt d'énergie et la dose absorbée.

La troisième partie présentera les différents résultats obtenus au cours de ces trois années, avec : D) les caractéristiques de la ligne de micro-irradiation que sont la taille de faisceau et la précision de tir, ainsi que l'efficacité de détection des deux détecteurs développés durant ces trois années ; E) les résultats obtenus *in vitro* à l'échelle cellulaire, issus des protocoles d'irradiation et de suivi en ligne des conséquences de ces irradiations avec deux protéines impliquées dans les mécanismes de réparation des dommages ADN radio-induits directs et indirects ; F) les résultats issus de la transposition de ces protocoles *in vivo* à l'échelle multicellulaire, avec la micro-irradiation ciblée d'un compartiment subcellulaire donné au sein d'un embryon précoce du nématode *Caenorhabditis elegans*.

Enfin, la dernière partie se concentrera sur la discussion de ces résultats et les perspectives ouvertes par ces travaux.

CONTEXTE & ENJEUX

1. Radiobiologie : quelques définitions

Préalablement à la présentation des études de radiobiologie et des outils associés, il apparaît nécessaire de définir un certain nombre de notions qui seront utilisées tout au long de ce manuscrit.

L'étude de l'interaction entre les rayonnements, notamment ionisants, et le vivant est un vaste domaine, qui couvre la caractérisation des effets biologiques de ces rayonnements, leurs conséquences de l'échelle cellulaire à celle de l'organisme, voire de sa descendance, mais également l'étude des moyens de se préserver des effets délétères de certains rayonnements et des traitements à suivre en cas de contamination et/ou irradiation.

Les rayonnements ionisants ont la particularité de disposer de suffisamment d'énergie pour arracher des électrons aux atomes du milieu traversé. Ces rayonnements sont de différentes natures : rayons X ou γ , électrons, neutrons ou ions. L'interaction des rayonnements ionisants avec la matière, vivante ou non, est caractérisée par un transfert d'énergie du rayonnement incident aux atomes du milieu exposé. Ce transfert d'énergie est le résultat d'une cascade d'événements physiques plus ou moins importants selon le type de rayonnement. Dans le cas des particules chargées, c'est principalement avec les électrons du milieu que se déroule la perte d'énergie, via la diffusion coulombienne, qui entraîne alors l'ionisation et/ou l'excitation du cortège électronique des atomes. Dans le cas des photons, l'interaction se fait aussi généralement avec les électrons du milieu, notamment via la diffusion Compton, l'effet photoélectrique, et la création de paires. La perte d'énergie de particules chargées ou de photons dans la matière est caractérisée par le Transfert d'Énergie Linéique (TEL), défini par la Commission Internationale de Protection Radiologique (ICRP) comme le rapport dE/dl où dE est l'énergie moyenne transférée localement au milieu, par la particule chargée ou le photon d'énergie spécifiée, sur une longueur dl (Hall 2000). Généralement donné en $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, le TEL dépend de la matière traversée et, pour un même type de particule, de son énergie incidente. Une bonne connaissance de ce TEL permet d'estimer la perte d'énergie le long de la trace d'une particule ionisante, et par extension la densité d'ionisations.

L'énergie transférée à la matière lors de l'exposition aux rayonnements ionisants est caractérisée par la dose absorbée. Cette dose est définie comme la quantité d'énergie déposée dans l'échantillon (en joules), par unité de masse (en kilogrammes). Elle est exprimée en Grays (Gy), et $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Parmi les données utilisées pour caractériser les effets des rayonnements ionisants sur la matière vivante, une des plus communément utilisées est l'efficacité biologique relative (EBR). Issue de résultats expérimentaux, elle permet la comparaison de divers types de rayonnements.

Cette efficacité s'exprime par rapport à une dose de référence, qui résulte en général d'une exposition à des rayons X ou à des photons (Friedrich *et al* 2013). L'EBR est alors donné par le rapport de la dose absorbée du rayonnement de référence (DR) sur la dose absorbée du rayonnement considéré (D) nécessaire pour obtenir un effet biologique équivalent : $EBR = DR/D$.

Parmi les rayonnements ionisants cités précédemment, le travail présenté ici se concentrera sur les ions. Par rapport aux autres types de rayonnements ionisants, les ions présentent le TEL le plus élevé, créant ainsi des dommages moléculaires plus denses au sein des cellules. Ils sont présents dans la radioactivité ambiante (particules α), les rayonnements cosmiques (protons, noyaux d'hélium), et sont de plus en plus utilisés dans les applications biomédicales (protonthérapie, hadronthérapie).

2. Les particules chargées en radiobiologie expérimentale

L'étude des effets des particules chargées sur le vivant nécessite de disposer d'outils et de méthodologies permettant de réaliser, en laboratoire, des expositions d'échantillons biologiques vivants à ces rayonnements et d'en visualiser les conséquences.

La manière la plus simple, au niveau de l'instrumentation et de la mise en œuvre, pour réaliser l'exposition d'échantillons biologiques vivants aux ions est l'utilisation de sources radioactives. Si elles permettent une irradiation homogène d'un grand nombre de cellules, les ions accessibles sont en général limités aux particules α . L'utilisation de faisceaux d'ions, couplés à un accélérateur capable de délivrer différents types d'ions, permet d'effectuer des irradiations avec des particules de TEL différents, inaccessibles par d'autres moyens plus classiques, ce qui rend possible l'étude de l'influence du TEL sur les effets biologiques des rayonnements ionisants.

La mise en place de faisceaux d'ions macroscopiques est relativement aisée, et présente l'avantage de pouvoir irradier des milliers de cellules en quelques minutes. Un grand nombre de travaux ont mesuré les effets d'une irradiation globale d'une population cellulaire par faisceau d'ions, en profitant du nombre important d'installations disponibles en Europe et dans le monde (Bailly *et al* 2002, Belli *et al* 1987, Besserer *et al* 1999, Folkard *et al* 1996, Geard *et al* 2002, Scampoli *et al* 2001, Kraft *et al* 1980, Wéra *et al* 2011, Prakrajang *et al* 2013). L'observable la plus utilisée dans ces différents travaux est la survie cellulaire des populations irradiées, pour déterminer l'efficacité biologique relative des irradiations. À partir de données de plus de 800 expériences réalisées depuis les années 70 dans différents laboratoires à travers le monde, obtenues après irradiations de populations cellulaires d'origine humaine ou animale par des faisceaux d'ions ou de photons, Friedrich *et al* ont constitué une base de données afin de caracté-

ser la relation entre cette efficacité biologique relative et le TEL, le type de particule, ainsi que la dose délivrée (Friedrich *et al* 2013).

Ces modes d'irradiation sont classiquement utilisés pour les études de radiobiologie expérimentale mais atteignent leurs limites dans le domaine des faibles doses à l'échelle cellulaire, pour lequel le nombre moyen de particules délivré par cellule se rapproche de un. Le nombre d'impacts par cellule suit alors une loi de Poisson, ce qui signifie que 37% des cellules ne reçoivent aucune particule, 37% en reçoivent une, et 26% en reçoivent plus d'une. Par ailleurs, ils ne permettent aucun contrôle précis de la cible subcellulaire irradiée. C'est pour pallier à ces limites qu'ont été créés les premiers microfaisceaux d'ions pour l'irradiation ciblée d'échantillons biologiques à dose contrôlée (Folkard *et al* 1997b, 1997a, Randers-Pehrson *et al* 2001).

Un microfaisceau est un cas particulier où le faisceau d'ions est collimaté ou focalisé jusqu'à atteindre un diamètre sur cible de l'ordre du micromètre. Les microfaisceaux d'ions sont utilisés depuis les années 1960 pour procéder à l'analyse chimique élémentaire d'échantillons en étudiant par exemple les photons X produits par les éléments chimiques de l'échantillon après leur interaction avec les particules issues du faisceau (Cookson and Pilling 1973, Watt and Grime 1987). Bien que le premier microfaisceau d'ions ait été développé dans les années 1950 par Zirkle et Bloom pour des études de radiobiologie (Zirkle and Bloom 1953), ce n'est que vers la fin des années 1990 que des microfaisceaux furent développés spécifiquement en tant qu'outils pour étudier les effets des rayonnements ionisants sur des échantillons biologiques vivants. Ceci est en partie dû aux avancées technologiques de cette décade dans plusieurs domaines : les systèmes de production et de détection de rayonnements ionisants, le positionnement des échantillons, la microscopie de fluorescence, les techniques d'imagerie numérique ainsi que de traitement d'images afin de visualiser et caractériser précisément les conséquences des rayonnements ionisants sur le vivant (Folkard *et al* 2001, Prise and Schettino 2011).

Trois points-clés ont motivé l'utilisation de microfaisceaux en radiobiologie (cf. Figure 1) (Prise and Schettino 2011) :

- Ils permettent un contrôle précis de la dose délivrée au sein de cellules individuelles. Dans le cas des microfaisceaux d'ions, ils permettent ainsi de délivrer un nombre précis de particules (de une à plusieurs) dans des cellules ciblées avec une forte reproductibilité. Ceci permet l'étude des effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur le vivant, en s'affranchissant du caractère aléatoire des irradiations plus classiques à de telles doses.

- Les microfaisceaux permettent de cibler avec précision un compartiment cellulaire donné, ce qui donne accès à l'étude de la radiosensibilité des différents compartiments cellulaires (noyau / cytoplasme).
- Les microfaisceaux permettent d'irradier spécifiquement une cellule donnée et d'observer les effets de cette irradiation sur les cellules environnantes. Ceci est un élément important dans l'étude des communications inter- et intracellulaire pour caractériser les effets non ciblés comme l'effet de proximité (Morgan and Sowa 2005).

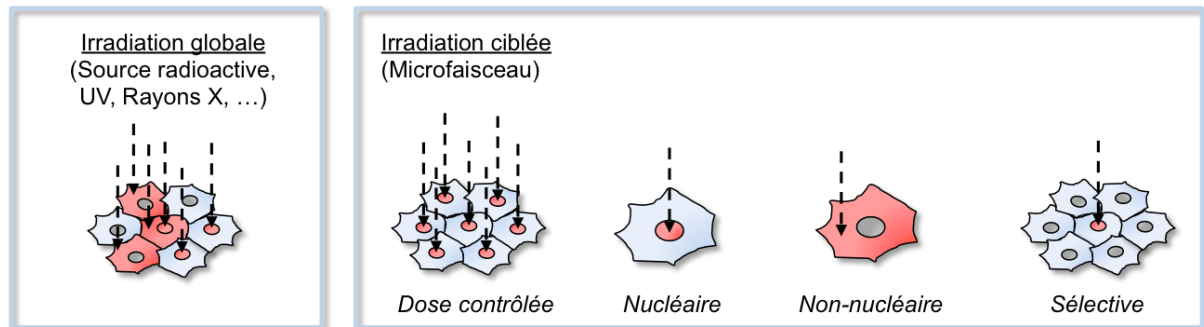


Figure 1 : Caractéristiques de l'irradiation par microfaisceau d'échantillons cellulaires. Par rapport à une irradiation globale, où la dose déposée est moyennée à l'échelle de la population cellulaire, l'irradiation ciblée par microfaisceau permet un contrôle absolu de la dose déposée sur chaque cellule, d'irradier sélectivement un compartiment subcellulaire donné, ou encore d'irradier une cellule ou une zone spécifique au sein d'un tapis cellulaire ou d'un tissu.

3. Les microfaisceaux de particules chargées pour la radiobiologie

3.1. Étude des faibles doses

La capacité des microfaisceaux d'ions à délivrer un nombre précis de particules par cellule prend tout son intérêt dans l'étude des risques associés à l'exposition environnementale à de faibles doses de rayonnements ionisants. Par exemple, dans le cas de l'exposition au radon, gaz radioactif émetteur de particules α , très peu de cellules reçoivent plus d'une particule. L'utilisation de microfaisceaux permet de s'affranchir du caractère aléatoire des irradiations par sources radioactives à cette échelle. Plusieurs études des effets des faibles doses de rayonnements ionisants ont été menées en utilisant les premiers microfaisceaux d'ions développés au Royaume-Uni et aux États-Unis.

Ainsi, Miller *et al* ont utilisé le microfaisceau d'ions développé au RARAF (*Radiological Research Accelerator Facility – Columbia University, New York, États-Unis*) afin d'étudier le potentiel oncogène de l'exposition de fibroblastes de souris à une seule particule α (Miller *et al* 1999). En comparant une irradiation par microfaisceau avec exactement une particule α par noyau cellulaire, et une irradiation classique avec un nombre moyen de particules, les auteurs ont montré que l'effet oncogène est significativement inférieur dans le cas d'une irradiation exacte, ce qui sug-

gère que l'extrapolation aux très faibles doses de données obtenues par des irradiations classiques surestime le risque de l'exposition à une seule particule. Des études similaires, menées par Hei *et al* ont toutefois souligné le potentiel toxique (20% de mort cellulaire) et mutagène (110 mutants pour 10^5 survivants) que peut avoir l'exposition de cellules même à une seule particule α (Hei *et al* 1997).

En utilisant le microfaisceau de protons du *Gray Laboratory* (Royaume-Uni), Prise *et al* ont exposé des cellules de hamster V79 à un nombre défini de protons de 3,2 MeV, et mesuré le taux d'apparition de micronoyaux au sein de ces cellules. Les micronoyaux sont formés lorsque des fragments de chromatine sont séparés du noyau principal lors d'une division. Ils sont considérés comme des marqueurs de dommages chromosomiques. Cette étude a montré une réponse linéaire entre la formation de micronoyaux et le nombre de protons délivrés (entre 1 et 30) (Prise *et al* 2000).

3.2. Étude de l'effet de proximité

Un des apports les plus importants des microfaisceaux en radiobiologie, outre le contrôle absolu de la dose, repose sur la possibilité offerte d'irradier de manière extrêmement localisée un point précis. Ainsi, au sein d'une population cellulaire, il est possible d'irradier une seule cellule ou une zone bien définie, et d'observer les effets sur les cellules environnantes. Ceci permet d'étudier avec plus de précision les effets induits par l'irradiation sur des cellules qui n'ont pas été directement irradiées. Ces effets sont appelés les effets non ciblés. Parmi eux, l'effet de proximité, également appelé effet *bystander*, est caractérisé par une réponse de cellules non irradiées à l'irradiation de leurs voisines. Les mécanismes qui lui sont associés sont actuellement le sujet de nombreuses études. La possibilité offerte de cibler une cellule au sein d'une population constitue l'un des principaux apports des microfaisceaux dans les années 2000 et permet ainsi d'étudier cet effet et d'appréhender les mécanismes de signalisation intra- et intercellulaires pouvant induire ce type de réponse (Prise *et al* 2009).

Les premières études de l'effet de proximité par microfaisceau ont montré que l'irradiation individuelle de fibroblastes primaires humains pouvait induire une réponse de type *bystander* après irradiation ciblée par un nombre défini d'ions ^3He , réponse se traduisant par une augmentation de la formation de micronoyaux et par de la mort cellulaire programmée (apoptose) (Prise *et al* 1998). Ces résultats ont été suivis par des études montrant que des cellules irradiées par microfaisceau pouvaient produire des réponses du type *bystander* susceptibles d'entraîner des mutations (Zhou *et al* 2000) et des transformations (Sawant *et al* 2001) chez des fibroblastes de hamster. Il a été montré par la suite, avec des fibroblastes primaires humains, que de tels effets

pouvaient être observés même après l'irradiation d'une seule cellule par un seul ion d'hélium (Belyakov *et al* 2001).

Des travaux plus récents ont étendu ces études avec l'utilisation de microfaisceaux d'ions lourds. Shao *et al* ont montré une augmentation significative du nombre de micronoyaux dans une population cellulaire après irradiation d'une seule cellule par des ions argon ou néon et ont fait le lien entre cette réponse et la production d'espèces réactives oxygénées lors de l'irradiation (Shao *et al* 2003). De même, Hamada *et al* ont montré notamment une augmentation de la mort cellulaire au sein d'une population où un nombre très faible de cellules avaient été irradiées par des ions carbone ou néon (Hamada *et al* 2008). Fournier *et al*, en 2007, se sont intéressés à l'impact de réponses du type *bystander* sur l'évolution du cycle cellulaire des cellules non irradiées. Ils ont montré que les changements observés dans la régulation et la progression du cycle cellulaire de ces cellules ne sont que transitoires (Fournier *et al* 2007).

3.3. Micro-irradiation et études à l'échelle de l'ADN

3.3.1. L'impact des rayonnements ionisants sur la molécule d'ADN

L'exposition du génome aux rayonnements ionisants remet constamment en cause son intégrité en entraînant l'apparition de lésions sur la molécule d'ADN. Ces lésions peuvent être induites soit de manière directe, soit de manière indirecte via les espèces réactives oxygénées issues de la radiolyse de l'eau. Plusieurs effets peuvent alors intervenir, comme la modification de bases (création de bases oxydées par exemple), la création de sites abasiques, la formation de cassures simple- ou double-brin de la double hélice d'ADN, ou encore la création de pontages intra-chaîne ou inter-chaînes ou entre l'ADN et des protéines environnantes, comme le montre la Figure 2. En réponse à ces dommages, des cascades de protéines sont recrutées au niveau des sites endommagés pour assurer leur signalement et éventuellement leur réparation (Polo and Jackson 2011).

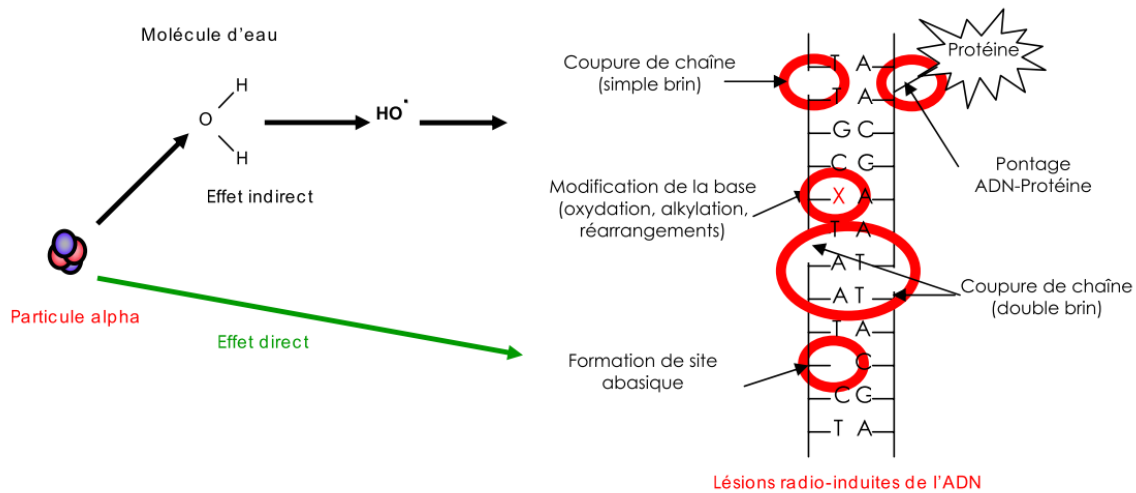


Figure 2 : Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN. Représentation schématique des effets directs et indirects (ici induits par une particule α) sur l'ADN. La particule va ioniser et endommager l'ADN (effet direct) ou interagir avec une molécule d'eau pour créer un radical libre (HO^\bullet) qui va réagir avec l'ADN (effet indirect). Les lésions radio-induites peuvent être de diverses natures, de la lésion affectant les bases, au pontage ADN-protéine ou ADN-ADN, ou encore aux cassures de brin (Pouthier 2006).

Deux types de réponse sont possibles suite à l'exposition aux rayonnements ionisants :

- Si les lésions de l'ADN sont trop importantes et non réparables, alors elles provoquent à plus ou moins long terme la mort de la cellule.
- Si les lésions sont réparables, un certain nombre de mécanismes de réparation de l'ADN entrent en action. Si la réparation est fidèle, cela n'aura pas de conséquence sur le futur de la cellule. En revanche, si cette réparation est fautive, cela peut engendrer l'apparition de séquences génétiques modifiées, provoquant l'apparition de mutations au niveau de l'information génétique ou de modifications chromosomiques (aberrations chromosomiques).

De nombreux complexes protéiques sont impliqués dans ces mécanismes. Ils interviennent notamment dans les voies de réparation par recombinaison homologue (HR, *Homologous Recombination*) ou non-homologue (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*), par excision des bases (BER, *Base Excision Repair*) ou des nucléotides (NER, *Nucleotid Excision Repair*) et dans la voie de réparation des mésappariements (MMR, *Mismatch Repair*) (Christmann *et al* 2003). L'ensemble des effets moléculaires radio-induits à l'échelle cellulaire concernant l'induction des dommages ADN et l'activation des voies de signalisation pour la réparation de ces dommages reste encore mal connue à l'heure actuelle.

Différents outils sont utilisés afin de générer des dommages ADN spécifiques aux rayonnements ionisants et pour suivre la réponse de certaines protéines, impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Ces outils sont basés sur l'exposition de noyaux cellulaires à différents types de rayonnements.

Comme mentionné précédemment, l'utilisation de microfaisceaux d'ions a montré son intérêt dans l'étude des effets biologiques de l'exposition aux faibles doses de rayonnements ionisants et de l'effet *bystander*. Plus récemment, l'irradiation par des particules chargées est apparue comme un moyen pour générer des sites de dommages extrêmement localisés, et spécifiques, le long de leur parcours dans la matière. En effet, les dommages générés par une particule chargée sont le résultat d'un cluster d'ionisations localisé le long de la trajectoire de la particule. Ces ionisations sont susceptibles de créer des dommages ADN complexes, avec une majorité de cassures double-brin. L'utilisation de microfaisceaux d'ions, avec les avantages énumérés précédemment, permet ainsi de générer des dommages au sein d'une zone micrométrique dans un compartiment subcellulaire défini. Associé au développement de techniques de marqueurs protéiques fluorescents, cette technique permet de visualiser et d'analyser l'accumulation de protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de ces dommages ADN, ainsi que leur mobilité à l'échelle cellulaire (Tobias *et al* 2010).

Les principales protéines étudiées par cette méthode font partie des différentes cascades protéiques liées à la reconnaissance et/ou à la réparation des cassures ADN double brin. Ces protéines sont très nombreuses et leur cascade est complexe et ne sera pas décrite ici. Nous nous concentrerons sur les plus communément utilisées. Le marqueur le plus fréquemment employé pour la visualisation des sites comportant des cassures ADN double brin est l'histone H2AX phosphorylée, notée γ -H2AX, qui a la propriété de se retrouver au niveau des sites ADN endommagés comportant des cassures double brin. Le marquage de γ -H2AX par immunofluorescence à l'aide de fluorochromes comme la protéine fluorescente verte (GFP – *Green Fluorescent Protein*), montre une localisation sous forme de points brillants, appelés foci (Aten *et al* 2004). D'autres protéines sont également visualisées par cette méthode. Citons par exemple ATM qui, lorsqu'elle est activée suite à une cassure double brin, va induire la phosphorylation d'autres protéines, comme p53 et l'histone H2AX. MDC1 est une protéine jouant un rôle clé dans l'assemblage de foci radio-induits et est une des premières protéines à s'accumuler sur les sites ADN présentant des cassures double brin, tout comme la protéine 53BP1 (Hable *et al* 2012). Les protéines Rad51 et Rad52 sont impliquées dans la réparation des cassures ADN double brin par recombinaison homologue. La protéine PARP, quant à elle, est impliquée principalement dans la signalisation des cassures ADN simple brin.

Le caractère spécifique des dommages générés par les ions, et la possibilité des microfaisceaux d'ions d'irradier avec précision une zone micrométrique au sein d'un compartiment subcellulaire donné en font des outils complémentaires aux techniques de micro-irradiation UV ou laser plus communément utilisées et permet d'étudier et quantifier les processus associés à l'induction et à la réparation de ces dommages radio-induits (Tobias *et al* 2010, Schettino *et al*

2011). Les microfaisceaux présentent même des avantages par rapport à ces autres techniques, dont la dosimétrie reste difficile à évaluer (Splinter *et al* 2010), qui nécessitent l'utilisation d'agents sensibilisants pouvant modifier par ailleurs la chromatine (Limoli and Ward 1993), et où les types de dommages générés dépendent grandement du type de laser utilisé (Dinant *et al* 2007, Kong *et al* 2009, Grigaravicius *et al* 2009). Par ailleurs, la possibilité de procéder à des micro-irradiations selon des motifs géométriques définis permet de caractériser la mobilité et l'évolution spatiale des dommages radio-induits avec le temps (Tobias *et al* 2010, Girst *et al* 2013, Hlatky 2012).

3.3.2. Études des mécanismes de détection et de réparation des dommages ADN par microfaisceau

Couplée à des techniques d'immunomarquages afin de visualiser les conséquences des dommages ADN radio-induits sur certaines protéines, l'utilisation de microfaisceaux pour l'étude des mécanismes de signalisation et de réparation de l'ADN a débuté au début des années 2000 (Durante and Friedl 2011).

Ainsi, Tartier *et al* ont procédé à l'irradiation de noyaux cellulaires par des protons de 3,2 MeV issus du microfaisceau du *Gray Laboratory*. Leur étude a montré la réponse immédiate à l'irradiation de la protéine PARP, et le recrutement concomitant des protéines ATM et Rad51 (Tartier *et al* 2003). Par la suite, Hauptner *et al* ont utilisé le microfaisceau développé au SNAKE (*Superconducting Nanoscope for Applied Nuclear (Kern-) Physics Experiments*) à Munich (Allemagne) pour procéder à l'irradiation de noyaux cellulaires selon un motif géométrique. Ils ont montré que les modifications et recrutements de protéines dus à l'irradiation se retrouvent suivant ce motif géométrique (Hauptner *et al* 2004). L'irradiation selon des motifs géométriques a également permis à Greubel *et al* d'analyser les effets de micro-irradiations séquentielles et de mettre en avant un effet de compétition pour le recrutement de la protéine 53BP1 (Greubel *et al* 2008). Girst *et al* ont tiré parti de la capacité des microfaisceaux d'ions à procéder à des micro-irradiations selon un motif régulier pour suivre le mouvement de foci MDC1. Une mobilité suivant un phénomène de subdiffusion a été mise en évidence par ces travaux (Girst *et al* 2013).

L'utilisation de techniques d'imagerie en temps réel en parallèle de l'irradiation et de protéines couplées à un fluorochrome comme la GFP permet de caractériser la cinétique du recrutement des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation des dommages ADN radio-induits. Ainsi, plusieurs installations ont mis en place un système de vidéomicroscopie en ligne pour pouvoir visualiser ces phénomènes biologiques quelques secondes seulement après irradiation. De tels systèmes ont été mis en place, tout d'abord à GSI (Darmstadt, Allemagne) (Jakob *et al* 2005) sur une ligne de faisceau non focalisé, puis notamment sur les microfaisceaux du SNAKE

(Hable *et al* 2009), du PTB (Allemagne) (Giesen *et al* 2011), de GSI (Du *et al* 2008, Merk *et al* 2013).

De premières études ont ainsi été menées par Mosconi *et al*, qui ont étudié et comparé les cinétiques de formation de foci 53BP1 et MDC1 après irradiation par des particules α ou des protons. Il a été montré que, aussi bien avec des particules de haut TEL que de faible TEL, les foci 53BP1 et MDC1 générés sont de taille similaire, avec une légère différence de cinétique selon le type de particule. Ils ont montré dans tous les cas la présence d'un décalage temporel entre le recrutement de MDC1 et celui de 53BP1, confirmant le caractère hiérarchique de ces deux protéines (Mosconi *et al* 2011). Plus récemment, Hable *et al* ont étudié les cinétiques de recrutement des protéines MDC1, 53BP1 et RAD52 après micro-irradiation. Deux types d'ions ont été comparés pour créer des dommages de complexités différentes : des ions carbone de 43 MeV, qui ont un fort TEL et créent ainsi des dommages ADN complexes sous la forme de clusters de cassures ADN, et des protons de 20 MeV, ayant un TEL plus faible et créant des cassures ADN plus isolées. La cinétique de recrutement de 53BP1 reste constante quel que soit le type d'ion considéré. En revanche, les recrutements des protéines MDC1 et RAD52 sont plus rapides après irradiation par des particules de fort TEL que par des particules de TEL plus faible. Ceci signifierait que les recrutements des protéines MDC1 et RAD52 dépendent de la complexité des dommages générés, ce qui n'est pas le cas pour 53BP1 (Hable *et al* 2012).

Ce sujet devrait prendre une part importante des études menées dans les prochaines années. Par ailleurs, étant donné que la grande majorité des données sur la cinétique et l'interdépendance du recrutement de protéines sur les sites endommagés ont été obtenues en utilisant la micro-irradiation par laser (Bekker-Jensen and Mailand 2010), il peut être intéressant de vérifier si ces données sont mesurées après micro-irradiation par faisceaux d'ions, compte tenu du caractère spécifique des dommages ADN générés (Durante and Friedl 2011).

3.4. Du cellulaire au multicellulaire

Si les modèles cellulaires *in vitro* permettent la caractérisation de certains mécanismes biologiques radio-induits, la transposition de ces résultats de l'*in vitro* vers l'*in vivo* ne peut se faire directement car ils ne prennent pas en compte les réponses tissulaires plus complexes qui peuvent intervenir. L'irradiation de modèles multicellulaires *in vivo* peut donc permettre une meilleure étude de ces phénomènes, et représente un défi technologique certain (Griffith and Swartz 2006, Durante and Friedl 2011).

Dans un premier temps, ce sont des modèles de peau reconstruits qui ont été étudiés. Belyakov *et al* ont ainsi étudié la réponse des parties non-irradiées d'échantillons de peau humaine reconstruite soumis au microfaisceau d'ions du RARAF en un point spécifique. Cette étude a mon-

tré un effet biologique au sein des cellules non irradiées situées jusqu'à 1 mm du point irradié (Belyakov *et al* 2005). Sedelnikova *et al* ont étudié la formation de cassures double-brin de l'ADN au sein de cellules non-irradiées dans un tissu humain tridimensionnel soumis à une irradiation par microfaisceau. Il a été observé que 12 à 48 heures après irradiation, 40 à 60% des cellules non-irradiées ont montré une réponse biologique de type *bystander* (Sedelnikova *et al* 2007).

Dans le cadre de l'étude de nouveaux modes de traitements du cancer par protonthérapie, Schmid *et al* ont cherché à comparer l'EBR, sur un modèle de peau humaine reconstruite, de deux modes d'irradiation par microfaisceau de protons de 20 MeV : un mode continu et un mode pulsé (1 ns par pulse). L'irradiation s'est déroulée au SNAKE à Munich. L'EBR a été évaluée à partir de la formation de micronoyaux radio-induits. Aucune différence significative n'a pu être démontrée entre les deux modes d'irradiation (Schmid *et al* 2010). Dans ce cadre également, Greubel *et al* ont réalisé le même type d'expérience sur un dispositif pour procéder à l'irradiation de tumeurs sous-cutanées chez la souris par un faisceau de protons pulsé ou continu (Greubel *et al* 2011).

L'un des défis actuels de l'irradiation par microfaisceau est le passage d'irradiations *in vitro* à des irradiations à l'échelle multicellulaire *in vivo* sur des modèles animaux. Jusqu'à présent, la plupart des études se sont concentrées sur de petits organismes multicellulaires. Ainsi, Fukamoto *et al* ont développé une méthode d'irradiation ciblée de larves de ver à soie par un microfaisceau d'ions lourds dans le cadre d'études de microchirurgie. Ils ont notamment étudié la suppression d'un phénotype de multiplication cellulaire anormale chez un mutant après irradiation par des ions carbone de 220 MeV (Fukamoto *et al* 2007). Choi *et al* se sont intéressés aux effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur des embryons de poisson zèbre (Choi *et al* 2010, 2012). Ces deux modèles constituent des modèles multicellulaires classiquement utilisés en biologie, mais posent un certain nombre de contraintes qui rendent leur utilisation complexe pour l'irradiation par microfaisceau et le suivi en ligne.

Le nématode *Caenorhabditis elegans* fait partie des modèles de référence en biologie. Il présente l'avantage d'être facilement maintenu en culture, il est transparent, et son génome est entièrement séquencé. Il possède un nombre fixe de cellules : 959 pour l'adulte hermaphrodite (99,5% des individus) et 1031 pour l'adulte mâle (0,5% des individus). Par ailleurs, son développement de l'embryon au stade adulte et son lignage cellulaire sont invariants et parfaitement connus. Il partage 70% de gènes homologues avec l'homme. Il constitue un modèle de choix pour caractériser l'exposition environnementale à un certain nombre de contaminants, et est notamment utilisé par la NASA pour déterminer les conséquences de l'exposition aux rayonnements ioni-

sants liée à un séjour plus ou moins prolongé dans l'espace. D'un point de vue pratique, ses dimensions sont compatibles avec l'utilisation des microfaisceaux et, à l'inverse de modèles comme les embryons de poisson zèbre qui nécessitent une préparation préalable pour les extraire de leur coque de protection, ne nécessitent pas de préparation particulière hormis une immobilisation.

L'irradiation par microfaisceau de ce nématode représente un défi technologique car elle nécessite le ciblage d'une cellule spécifique au sein d'un organisme multicellulaire vivant et en mouvement. Les techniques de microscopie et de ciblage doivent donc être extrêmement performantes afin de permettre une irradiation précise. Les premiers travaux de ce type ont été réalisés par Takanami *et al*, qui ont combiné l'utilisation des faisceaux d'ions avec *C. elegans* pour mettre en évidence la formation d'aberrations chromosomiques au sein des cellules germinales de vers adultes après irradiation par des ions lourds (carbone de 125 MeV et argon de 95 MeV) (Takanami *et al* 2003). Sugimoto *et al* ont montré l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire ainsi que de phénomènes d'apoptose au sein des cellules germinales irradiées localement par un microfaisceau d'ions carbone de 220 MeV (Sugimoto *et al* 2006). Plus récemment, Buonanno *et al*. ont mis en évidence la formation de foci Rad51, protéine impliquée dans la réparation des cassures ADN double brin par recombinaison homologue, après irradiation par microfaisceau de protons de 4,5 MeV (Buonanno *et al* 2013). Dans le cadre de l'évaluation d'effets biologiques plus complexes comme l'effet de proximité, Bertucci *et al* ont procédé à l'irradiation d'une lignée de *C. elegans* exprimant la protéine hsp-4 fusionnée à la GFP. L'exposition d'un individu à un stress chimique ou thermique entraîne une augmentation de l'expression de cette protéine dans la totalité du corps du ver. De jeunes nématodes adultes ont été irradiés au niveau de la queue par le microfaisceau de protons du RARAF. Une augmentation du signal de fluorescence a été observée à plus de 100 µm de la queue 24h après irradiation (Bertucci *et al* 2009). De nos jours, *C. elegans* constitue l'organisme multicellulaire le plus utilisé pour l'irradiation par microfaisceau d'ions.

4. Micro-irradiation et dosimétrie

L'irradiation par microfaisceau de particules chargées conduit à un dépôt d'énergie très localisé au sein de la cellule. La définition de la dose absorbée atteint ici ses limites et les méthodes utilisées dans le cas d'irradiations aléatoires ne peuvent être facilement transposées.

En effet, dans le cadre de l'irradiation globale d'un noyau cellulaire par des particules chargées, l'énergie déposée peut être estimée simplement en faisant le produit du TEL de la particule considérée (supposé constant tout au long de la traversée du milieu) par la somme des longueurs des traces des ions. En normalisant par la masse totale du noyau, la dose absorbée est obtenue

(Splinter *et al* 2010). En revanche, dans le cas d'une irradiation ciblée d'échantillons biologiques par microfaisceau d'ions, l'exposition aux particules chargées se fait sur une zone bien définie, de taille micrométrique, au sein d'une structure subcellulaire, alors que la zone environnante n'est pas irradiée. Le caractère hautement localisé du dépôt d'énergie des particules rend alors inadaptée la définition d'une dose calculée sur la totalité du volume du noyau et il convient de considérer la dose absorbée au sein de la zone irradiée uniquement.

Pour cela, il est nécessaire d'avoir recours à la modélisation numérique afin de simuler la distribution spatiale des particules et de leurs traces dans l'échantillon et en déduire la topologie du dépôt d'énergie dans la zone irradiée. En effet, ces informations ne sont pas mesurables directement lors de l'irradiation et il est nécessaire d'avoir recours aux techniques de modélisation Monte-Carlo, développées depuis de nombreuses années pour la physique nucléaire et la physique des particules.

4.1. Les outils de la modélisation

Les outils numériques permettant de modéliser l'interaction rayonnement-matière reposent sur la méthode Monte-Carlo. Cette méthode reproduit la nature stochastique de l'interaction des particules élémentaires avec la matière en utilisant des tirages aléatoires. Aujourd'hui la dénomination de cette méthode, qui date des années 40, est réservée aux calculs numériques réalisés sur ordinateur. Elle connut un véritable essor avec le projet Manhattan pour la conception de la bombe atomique. Son application en tant qu'outil de recherche moderne est amenée par Nicholas Metropolis en 1947. Le premier code Monte-Carlo destiné au transport de particules, MCS, écrit en FORTRAN, date de 1963. En 1965, MCN remplace MCS et en 1977, il est réécrit en FORTRAN 77 et devient MCNP. De nos jours, un certain nombre de codes existent et sont largement accessibles. Parmi les plus utilisés, nous pouvons citer Fluka (Ferrari *et al* 2005), Geant4 (Agostinelli *et al* 2003, Allison *et al* 2006), MCNP/MCNPX (MCNP 2003) et Penelope (Salvat *et al* 2006).

Les codes de transport de rayonnements et les codes Monte-Carlo de structures de traces, initialement développés pour le dimensionnement d'expériences de physique sont aujourd'hui largement utilisés en biophysique, dosimétrie et microdosimétrie, radiothérapie clinique, et radioprotection.

4.2. Évaluation de la dose à l'échelle cellulaire

La principale difficulté pour l'évaluation de la dose absorbée à l'échelle cellulaire est la nécessité de raisonner non plus à l'échelle d'un organe comme cela se fait dans le cadre d'études médicales ou de radioprotection, mais à l'échelle de la cellule. Dans ce cas, l'élément de masse utilisé

pour le calcul de la dose absorbée est très réduit, ce qui entraîne une valeur de la dose absorbée très élevée par rapport aux chiffres généralement considérés à l'échelle macroscopique.

À l'échelle micrométrique, des calculs de microdosimétrie sont nécessaires afin de modéliser les processus physiques intervenant et la structure du dépôt d'énergie à l'échelle cellulaire. Des outils de modélisation de plus en plus fins ont été développés dans ce sens ces dernières années (Nikjoo *et al* 1998, 2006).

À cette échelle, la plupart des codes existants cherchent à évaluer le dépôt d'énergie des particules dans les compartiments cellulaires principaux (noyau et cytoplasme). Les calculs de dose sont réalisés dans des modèles cellulaires de géométries simples, basées sur la combinaison de volumes mathématiques de base (sphères, ellipsoïdes, cylindres, etc.).

Ainsi, Alard *et al* ont modélisé le dépôt d'énergie de neutrons de 14,1 MeV dans des cellules représentées par des hémisphères placées face au flux de neutrons (Alard *et al* 2002). D'autres méthodes et codes de calculs ont également été utilisés pour caractériser l'exposition de modèles cellulaires sphériques à des radio-isotopes dans le cadre de traitements par injection ou par immuno-radiothérapie. Différents calculs de dépôts d'énergie ou de dose ont été réalisés pour des émetteurs de particules α (Beaton *et al* 2011, Tung *et al* 2004, Roeske and Hoggarth 2007) ou d'électrons (Champion *et al* 2008).

Cependant, ces modèles géométriques ne prennent pas en compte la variété des différentes géométries rencontrées dans une population cellulaire typique (variations morphologiques, variations en fonction du cycle cellulaire, ...). Pour pallier à cette limitation, plusieurs approches ont été proposées. Douglass *et al* ont développé un algorithme produisant des modèles cellulaires aux coordonnées spatiales et tailles aléatoires. La position des compartiments subcellulaires au sein de chaque cellule (noyau, nucléole, réticulum endoplasmique) est aussi partiellement aléatoire (Douglass *et al* 2012). Toutefois, ce modèle reste basé sur des volumes ellipsoïdaux simples. Incerti *et al* ont modélisé, à l'aide de Geant4, l'irradiation d'un modèle réaliste de cellule épithéliale par microfaisceau d'ions. Cette approche tire avantage de la possibilité, dans Geant4, d'importer des géométries voxellisées. Ce modèle cellulaire est ainsi basé sur l'imagerie confocale haute résolution, et sa composition chimique élémentaire sur des données obtenues au CENBG par analyse par faisceau d'ions. Il permet ainsi des calculs plus réalistes de dépôt d'énergie et de dose, notamment dans le cas d'irradiation avec des particules de quelques MeV où l'influence des variations de géométrie cellulaire a un impact non négligeable sur le dépôt d'énergie. Cet outil rend également possible la caractérisation de la distribution spatiale de ces dépôts d'énergie (Incerti *et al* 2009). Plus récemment, Barberet *et al* ont étendu ce modèle à l'irradiation d'une monocouche cellulaire par microfaisceau d'ions ou par source radioactive afin

de mettre en évidence l'influence de la variabilité morphologique des cellules dans une population sur le calcul de la dose absorbée (Barberet *et al* 2012). Miller *et al* ont également montré l'intérêt d'utiliser la microscopie confocale pour modéliser l'irradiation par microfaisceau d'électrons d'un tissu multicellulaire tridimensionnel (Miller *et al* 2011).

5. Le microfaisceau d'ions du CENBG

5.1. Historique et caractéristiques

Au début des années 2000, le CENBG a développé un système de microfaisceau pour réaliser des expériences de radiobiologie. Cet outil est décrit par Barberet *et al* (Barberet *et al* 2005). Il repose sur une ligne de faisceau préexistante, développée au début des années 90 pour l'analyse élémentaire d'échantillons sous vide, et ci-après dénommée « microsonde nucléaire » (Moretto *et al* 2001). Dans ce système, un faisceau de protons ou de particules alpha de 3,5 MeV était délivré par un accélérateur Van de Graaff de 4 MV, et focalisé jusqu'à atteindre un diamètre d'environ un micromètre sous vide. Pour l'irradiation d'échantillons biologiques vivants, un dispositif amovible a été conçu pour remplacer le couvercle de la chambre d'analyse de matériaux sous vide et permettre l'extraction à l'air du faisceau pour l'irradiation d'échantillons vivants (cf. Figure 3).

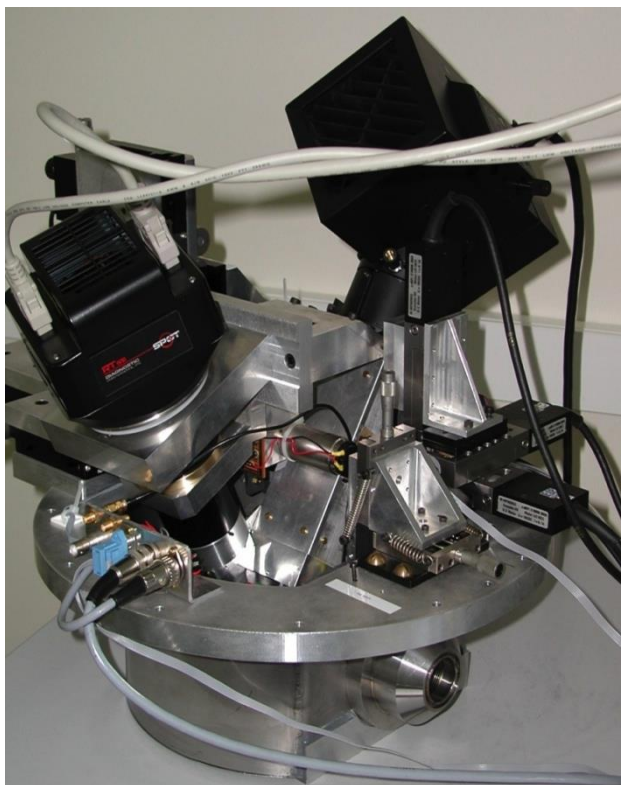


Figure 3 : Étage terminal du premier dispositif de micro-irradiation d'échantillons biologiques vivants par faisceau d'ions développé au CENBG. Pour réaliser les irradiations, cet étage devait être inséré dans la chambre d'analyse de l'ancienne microsonde. Sur cette figure, la caméra CCD associée au système de microscopie (à gauche), la lampe UV pour l'illumination des échantillons (à l'arrière-plan), ainsi que les platines de positionnement du porte-échantillon, sont visibles. (Pouthier 2006)

Le dispositif d'irradiation a été conçu pour délivrer des particules au sein de cellules cultivées dans un puits de culture dédié, placé verticalement devant le faisceau d'ions qui se propage de manière horizontale. Ce puits, fabriqué en polyéthylène, permet de maintenir les cellules dans leur milieu de culture, et ainsi de maintenir de bonnes conditions physiologiques. Les cellules sont adhérentes à une feuille de polypropylène, tendue sur un côté du puits, tandis que l'autre côté est fermé au moyen d'une lamelle de verre. Les cellules sont visualisées en ligne au moyen d'un système de microscopie à épifluorescence couplée à une caméra CCD. Elles sont illuminées au moyen d'une lampe à mercure et visualisées en fluorescence. Le puits de culture est lui-même positionné par un système de platines motorisées de haute précision.

Pour la détection des particules α de 3 MeV, un système basé sur un détecteur à gaz basse pression (isobutane à 10 mbar) était utilisé en routine pour l'irradiation d'échantillons avec un contrôle de dose ion par ion ayant une efficacité de détection supérieure à 95%. L'anode était constituée d'un fil d'or de 10 μm de diamètre, et l'interface entre le gaz et l'atmosphère ambiante assurée par une fenêtre de Si_3N_4 de 150 nm d'épaisseur. Afin de maintenir de bonnes conditions de vide dans la ligne, tout en limitant la dégradation de la résolution spatiale du faisceau lors de

la traversée de matière, son parcours dans le gaz était limité à 3,5 mm, et la fenêtre d'entrée du détecteur était constituée par un collimateur de 10 μm de diamètre. Ceci imposait cependant de garder un faisceau fixe pendant l'irradiation, et de positionner mécaniquement chaque cible à irradier sur la trajectoire des ions.

Plusieurs paramètres ont été mesurés sur ce dispositif (cf. Figure 4). La capacité du système à contrôler le faisceau jusqu'à 1 ion par point a été montrée sur détecteurs de traces (CR39). Le diamètre du faisceau sur cible a également été évalué sur CR39. Ainsi, il a été mesuré que plus de 95% des particules délivrées sont situées dans un cercle de 10 μm de diamètre, pour des particules α de 3 MeV détectées à l'aide du détecteur à gaz basse pression. La précision de tir du système, quant à elle, était suffisante pour procéder à l'irradiation ciblée de noyaux cellulaires. Enfin, la fréquence de l'irradiation ciblée de noyaux cellulaires dans cette configuration (faisceau fixe, particules α de 3 MeV détectées avec le détecteur à gaz), incluant les phases d'étalonnage, de localisation des cibles, et l'irradiation, était d'environ 2000 noyaux par heure.

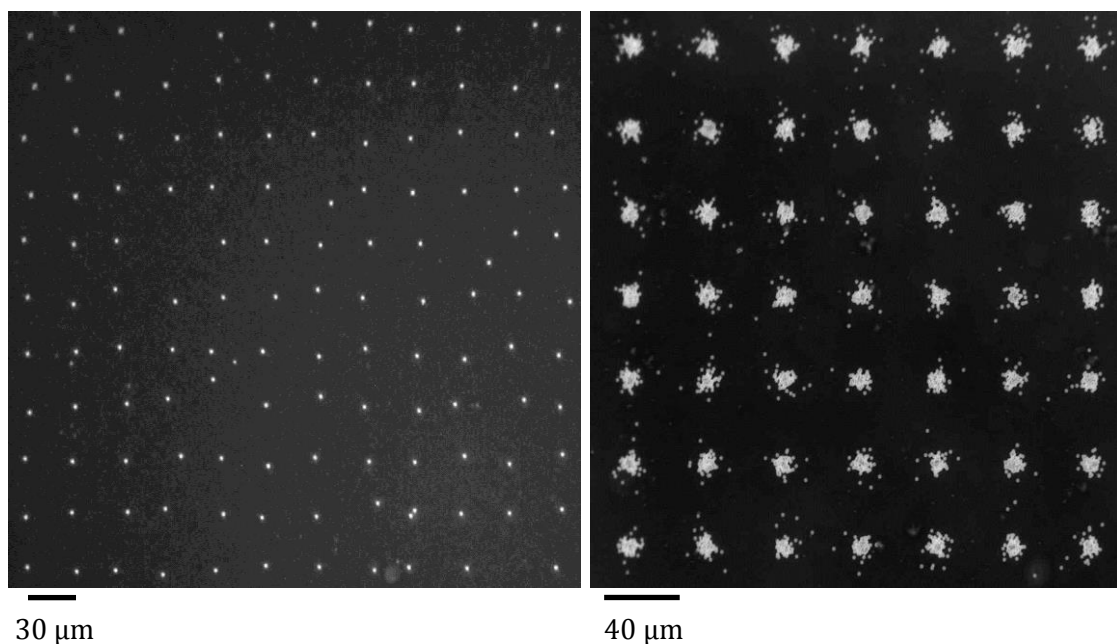


Figure 4 : Performances de l'ancien système d'irradiation du CENBG.

À gauche : irradiation de détecteur de traces (CR39) avec comptage des particules α de 3 MeV. Une particule α a été déposée par point après détection via le système à gaz. Les doubles-impacts représentent moins de 1% des points, et environ 2% des cibles n'ont pas été irradiés.

À droite : évaluation de la taille de faisceau sur détecteur de traces. 100 particules α ont été déposées sur chaque point après détection par le système à gaz. 95% des ions sont situés dans un cercle de 10 μm de diamètre. (Barberet 2003)

En 2006, la microsonde nucléaire ainsi que le dispositif d'irradiation d'échantillons biologiques vivants ont été intégrés à la plate-forme AIFIRA nouvellement mise en service, décrite dans le chapitre A-1.1.1.

Lors des différentes campagnes d'irradiations d'échantillons biologiques réalisées lors des dernières années, un certain nombre de limites ont été identifiées sur cette première version du

dispositif de micro-irradiation du CENBG. En effet, la modification de la chambre d'analyse de la microsonde, nécessaire pour passer en configuration d'irradiation, entraîne un certain nombre de contraintes mécaniques causant des problèmes de reproductibilité des irradiations d'une expérience à l'autre. La Figure 5 montre que la précision de tir du système s'en retrouvait affectée, avec une dégradation pouvant être rédhibitoire sur le ciblage des échantillons.

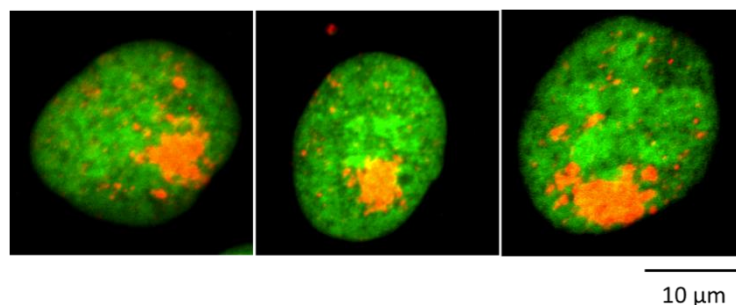


Figure 5 : Reproductibilité du ciblage de l'ancien système de micro-irradiation du CENBG. Irradiation de noyaux cellulaires exprimant l'histone H2B couplée à la GFP (vert) par 50 particules α de 3 MeV. La phosphorylation de l'histone H2AX est marquée en rouge. Le ciblage est variable d'un noyau à l'autre, avec certains irradiés sur le côté.

Le système de détection à gaz pour le comptage des particules α présentait une très bonne efficacité de détection, mais entraînait un élargissement important du faisceau. Ceci est visible sur la Figure 4 (à droite), où un certain nombre de particules sont diffusées par le gaz à un grand angle, et ce même à basse pression. Par ailleurs, ce dispositif, initialement conçu pour l'étude des faibles doses, ne permettait pas d'évolution vers les applications émergentes des microfaisceaux décrites précédemment : la micro-irradiation couplée à la vidéomicroscopie et l'irradiation d'organismes multicellulaires.

5.2. Évolutions du dispositif

Suite au démarrage de la plate-forme AIFIRA en 2006, une ligne de faisceau exclusivement conçue pour l'analyse à haute résolution d'échantillons sous vide a été mise en service en 2009. Cette ligne, baptisée « nanofaisceau », dispose d'une chambre d'analyse ainsi que d'un système de focalisation optimisé pour fournir un faisceau d'ions avec une résolution spatiale optimale, de 300 nm (Barberet *et al* 2009, 2011). Le transfert des activités d'analyse par faisceau d'ions sur cette nouvelle ligne a permis la reconstruction totale du dispositif de micro-irradiation d'échantillons biologiques vivants sur une ligne dédiée, et en prenant en compte le retour d'expérience de la première version du système.

Le système n'étant plus limité par l'encombrement mécanique et l'utilisation de la ligne pour des applications multiples, un certain nombre de points ont été retravaillés, notamment la totalité de l'étage terminal, pour le rendre plus stable et le doter d'un système de microscopie moderne et évolutif, et une interface utilisateur entièrement repensée. Par ailleurs, un travail d'optimisation

de la résolution spatiale du faisceau ainsi que de la précision de tir et de la reproductibilité des irradiations a accompagné ce développement instrumental.

C'est dans ce cadre que se situe ce travail de thèse. Le développement de la ligne de micro-irradiation faisant l'objet de ce manuscrit a été effectué de manière à disposer d'une grande flexibilité quant aux applications en radiobiologie. Ce dispositif a donc été conçu de manière très modulaire et évolutive. À mon arrivée en 2010, la reconstruction de la ligne se terminait. Mes objectifs étaient i) la mise en service du dispositif, avec notamment l'alignement mécanique des différents éléments d'optique, ii) la prise en main du développement du logiciel d'irradiation, iii) la caractérisation du système d'abord sur détecteurs solides de traces, puis avec l'irradiation des premiers échantillons biologiques. Une fois ces étapes achevées, les premières expériences de biologie ont eu lieu, afin de mettre en place les différents protocoles d'irradiation en fonction du type d'échantillon à irradier et du type d'observable considérée. En parallèle, la caractérisation de la dosimétrie des micro-irradiations effectuées devait être mise au point en utilisant les outils Monte-Carlo développés au CENBG.

6. Installation d'un microfaisceau d'ions sur l'installation AMANDE de l'IRSN

Comme mentionné en introduction, le travail présenté dans ce manuscrit se situe également au cœur d'une collaboration entre le CENBG et l'IRSN qui, dans le cadre de ses programmes de recherche, et notamment du programme ROSIRIS, a souhaité s'équiper d'un microfaisceau pour explorer les dysfonctionnements radio-induits au niveau de l'ADN et les communications intra et intercellulaires. L'institut s'est alors rapproché du CENBG pour tirer parti de leur expertise dans ce domaine. Ainsi, la nouvelle version de la ligne microfaisceau pour l'irradiation, développée au CENBG sur la plate-forme AIFIRA, fait office de prototype pour une autre ligne microfaisceau, destinée à être mise en place sur l'installation AMANDE du Laboratoire de Métrologie et de Dosimétrie des Neutrons (LMDN) situé sur le site de Cadarache (Bouches du Rhône). Cette installation est actuellement utilisée pour produire des champs neutroniques monoénergétiques de référence (Gressier *et al* 2004). AMANDE est basée sur un accélérateur double étage de type Tandetron™ 2 MV construit par le constructeur néerlandais High Voltage Engineering Europa (HVEE).

Par rapport à AIFIRA, AMANDE est capable de fournir différents types d'ions, avec des énergies plus élevées, constituant ainsi une installation complémentaire. Ainsi, en supplément des protons et des deutons jusqu'à 4 MeV pouvant être produits dans la configuration initiale de l'installation, la mise en place récente de nouvelles sources d'ions permet l'utilisation d'ions He jusqu'à 6 MeV, et d'ions B, C, N ou O pouvant atteindre une énergie comprise entre 8 et 12 MeV.

La ligne microfaisceau pour l'irradiation d'échantillons biologiques sera placée dans une extension du bâtiment existant. Celle-ci a été conçue pour répondre aux différentes contraintes liées à un microfaisceau, notamment des contraintes mécaniques (vibrations, ...) ou thermiques. La salle abritant le microfaisceau sera couplée à un laboratoire de biologie entièrement équipé pour la culture des différents échantillons, leur préparation pour l'irradiation, et leur analyse.

La ligne de micro-irradiation est basée sur la ligne du CENBG. Elle a été conçue au CENBG et sa construction est en cours de finalisation par les services techniques du laboratoire. Elle est identique à la ligne en place sur AIFIRA, que ce soit dans son principe, ses constituants (notamment le système de microscopie), et son contrôle commande. Les mêmes fonctionnalités, mises en place sur la ligne du CENBG sont également disponibles sur la ligne de l'IRSN. Les performances attendues de cette ligne pour les protons et les particules α devraient donc être similaires à celle du CENBG, présentées dans ce manuscrit. Toutefois, et c'est particulièrement le cas pour les ions plus lourds, les sources de l'accélérateur AMANDE sont différentes et n'ont encore jamais été testées. Les performances en termes de taille de faisceau et de précision de tir restent spéculatives et nécessiteront une mesure précise une fois le système en service.

En ce qui concerne le calendrier de cette mise en place, les modifications sur l'accélérateur de particules (installation des nouvelles sources d'ions et d'un nouvel aimant à 90° pour l'entrée de la ligne microfaisceau) se sont achevées en novembre 2013. La construction de l'extension du bâtiment devrait démarrer au début de l'année 2014, suivie par la mise en place et la mise en service de la ligne microfaisceau.

MATÉRIEL & MÉTHODES

A – DÉVELOPPEMENT TECHNIQUE D'UNE LIGNE DE MICRO-IRRADIATION PAR FAISCEAU D'IONS

Comme décrit précédemment, l'équipe IPCV travaille depuis le début des années 2000 au développement de dispositifs pour la micro-irradiation ciblée d'échantillons biologiques vivants. Suite à une première version fonctionnelle, mais limitée, une nouvelle version a été développée depuis 2009 sur une ligne de faisceau dédiée de la plate-forme AIFIRA. Dans cette partie, cette ligne de faisceau, son contrôle-commande, et les procédures d'irradiation possibles sur ce dispositif seront décrits, ainsi que les différents systèmes de détection des ions, développés durant ces travaux.

1. Le microfaisceau d'ions pour l'irradiation

1.1. Description générale du dispositif

1.1.1. La plate-forme AIFIRA

La plate-forme AIFIRA est équipée d'un accélérateur électrostatique simple étage de type Singletron™ in-line de 3,5 MV, montré sur la Figure 6, conçu par HVEE (Mous *et al* 1997). Cet accélérateur fournit des faisceaux d'ions avec une brillance élevée, ainsi qu'une excellente stabilité en énergie ($\Delta E/E = 2,5 \cdot 10^{-5}$), ce qui est tout particulièrement adapté au développement de lignes à haute résolution spatiale.

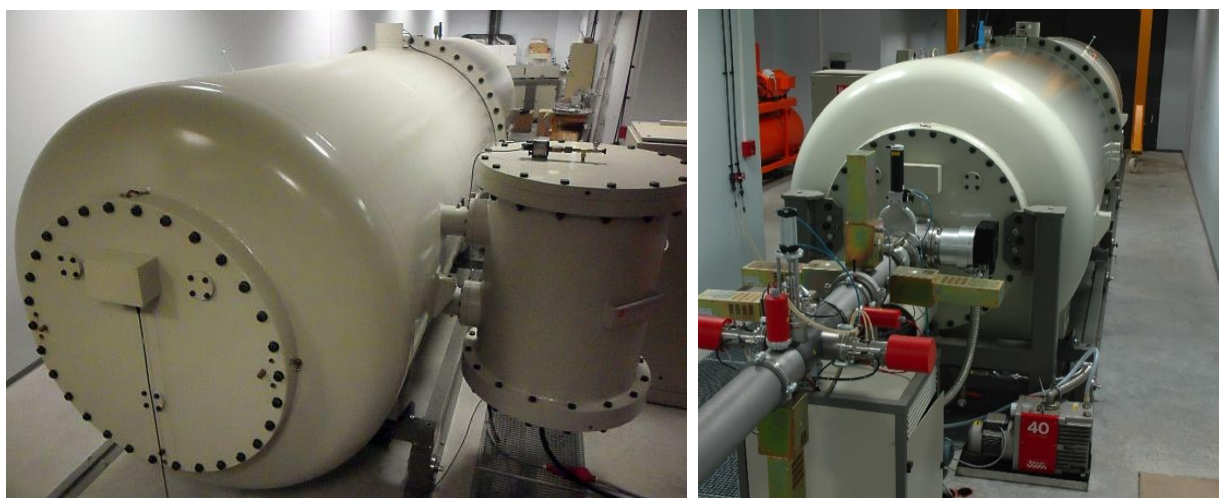


Figure 6 : Vues de l'arrière et de l'avant de l'accélérateur de particules de la plate-forme AIFIRA.

Cet accélérateur peut fournir des faisceaux de H^+ (protons), D^+ (deutons) et He^+ (particules α), avec une énergie comprise entre 800 keV et 3,5 MeV. Le faisceau horizontal sortant de l'accélérateur est sélectionné en énergie par un aimant d'analyse à 90°. Un aimant de commutation présent en aval permet de choisir la ligne dans laquelle injecter le faisceau.

La plate-forme est en effet équipée de 5 lignes de faisceau (cf. Figure 7), chacune dédiée à une application spécifique.

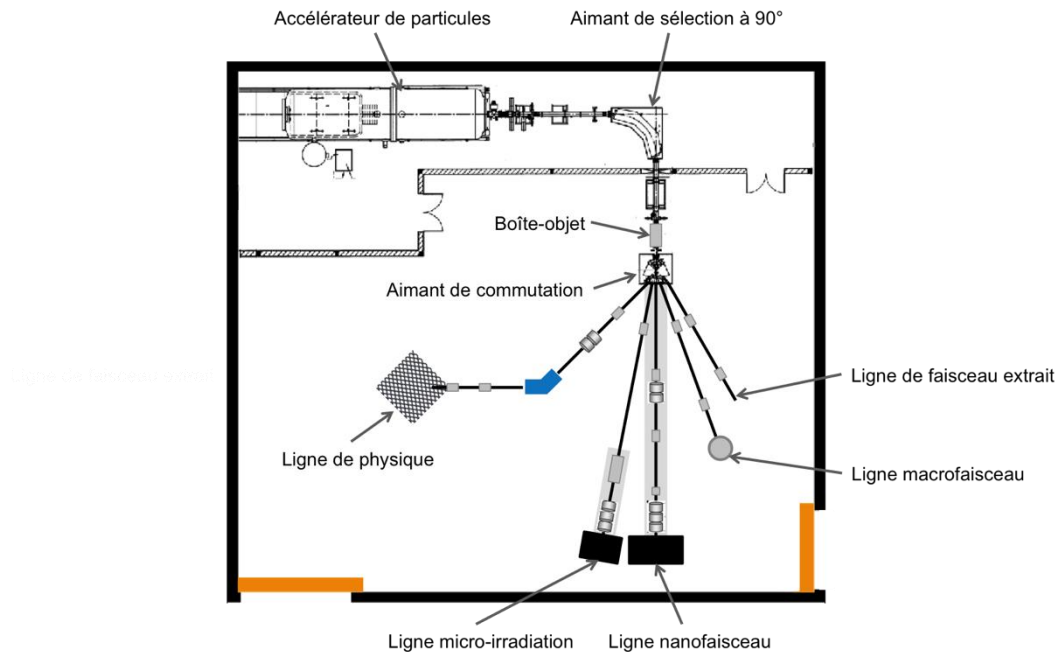


Figure 7 : Représentation schématique de la plate-forme AIFIRA. Le faisceau issu de l'accélérateur de particules passe au travers d'un aimant à 90° qui sélectionne les particules selon leur masse, leur charge et leur énergie. Un système de lèvres et de collimateurs dans la boîte-objet permet si besoin de définir précisément sa géométrie. L'aimant de commutation permet d'injecter le faisceau d'ions dans l'une des cinq lignes.

- La « ligne de physique » permet notamment la production de champs neutroniques monoénergétiques, utilisés dans le cadre d'études concernant l'incinération et la transmutation des déchets de l'industrie nucléaire, ainsi que la recherche de nouveaux combustibles.
- La « ligne macrofaisceau » délivre un faisceau de taille millimétrique allant de 0,5 à 2 mm selon les besoins. Ce dispositif permet l'analyse par RBS (*Rutherford Backscattering Spectrometry*), PIXE (*Particle-Induced X-ray Emission*) et NRA (*Nuclear Reaction Analysis*) d'échantillons massifs de dimensions centimétriques.
- La « ligne de faisceau extrait » permet d'étudier les échantillons les plus fragiles via l'extraction du faisceau d'ions à l'air. Ceci permet l'analyse directe d'un objet sans mise sous vide, mais aussi sans prélèvement ni traitement ce qui garantit donc parfaitement son intégrité.
- La « ligne nanofaisceau » délivre un faisceau de taille sub-micrométrique dans le vide, allant de 300 nm à 1 µm selon les techniques d'analyse. Elle permet l'analyse élémentaire d'échantillons de nature et d'origine variées allant des échantillons biologiques d'une dizaine de micromètres à des matériaux géologiques de dimensions millimétriques. Cette ligne permet l'analyse par STIM (*Scanning Transmission Ion Microscopy*), PIXE, RBS, NRA, ERDA (*Elastic Recoil Diffusion Analysis*) (Barberet *et al* 2011, Simon *et al* 2011).
- La « ligne microfaisceau » ou « micro-irradiation » est la ligne sur laquelle porte ce travail. Elle est décrite en détails dans les chapitres suivants.

1.1.2. La ligne de micro-irradiation

Le dispositif est décrit de manière schématique dans la Figure 8.

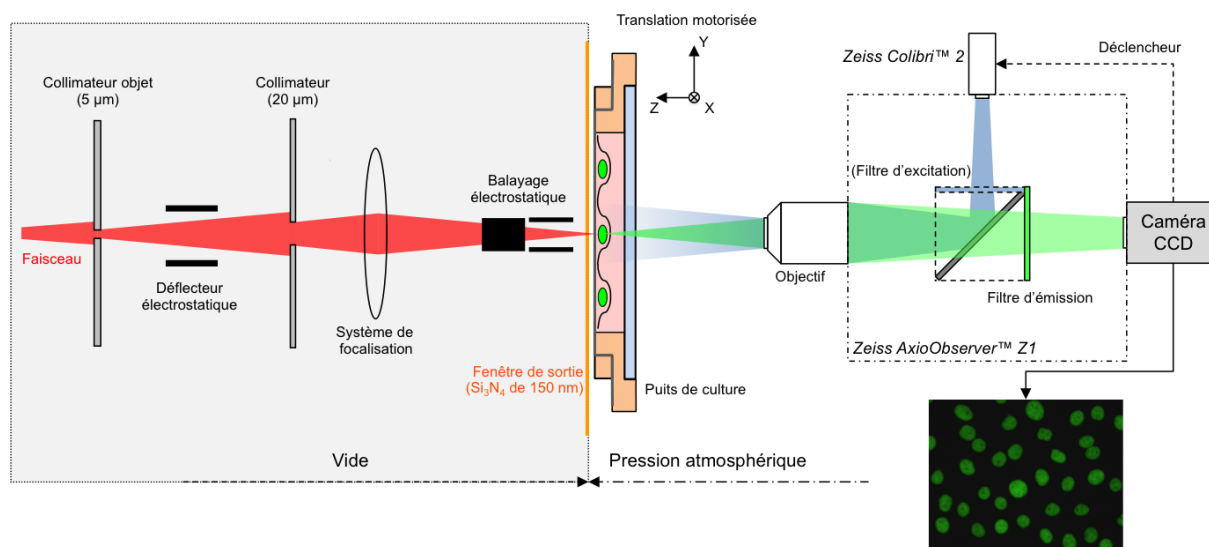


Figure 8 : Schéma du principe général de la ligne de micro-irradiation. Le faisceau d'ions (en rouge) se propage de gauche à droite tout d'abord dans le vide. Il est collimaté puis focalisé jusqu'à atteindre une taille micrométrique. Il est ensuite extrait à l'air au moyen d'une fenêtre de Si_3N_4 (en orange). L'échantillon à irradier (ici des cellules dans leur milieu de culture) est placé devant cette fenêtre d'extraction. Un microscope inversé à épifluorescence équipé d'une caméra CCD permet de visualiser l'échantillon, de repérer les zones d'intérêt, et de cibler les points d'intérêt pour l'irradiation. Des plaques de balayage électrostatique, placées juste avant la fenêtre d'extraction, permettent de positionner le faisceau sur la cible. Un système de détection d'ions peut être placé en amont du puits de culture. Il est couplé à un déflecteur électrostatique rapide, afin de couper le faisceau lorsque le nombre requis d'ions a atteint la cible.

Un microfaisceau d'ions focalisé comme celui présenté ici est, du point de vue de l'optique, très comparable à un système d'optique photonique centré. Ainsi, un certain nombre de notions se retrouvent en optique de faisceau d'ions, comme les notions d'objet, d'image, de grandissement (rapport entre les tailles de l'objet et de l'image) et d'aberrations (déformations de l'image par rapport à l'objet). La principale particularité de l'optique de faisceau réside dans la nature des dispositifs de focalisation, qui ne sont pas des lentilles convergentes « classiques », mais des associations de quadrupôles magnétiques.

Lorsqu'il sort de l'aimant de sélection à 90° , le faisceau passe dans une boîte dite « objet », dans laquelle différents étages de lèvres réduisent sa taille afin de n'en garder que le cœur. Le faisceau passe ensuite au travers d'un collimateur qui joue le rôle d'objet brillant. Le système de focalisation présent sur la ligne est un triplet de lentilles quadrupolaires magnétiques. Ces lentilles sont couplées entre-elles de manière à former un triplet « d'Oxford », représenté sur la Figure 9 (Grime and Watt 1984). L'alimentation, et par conséquent la focalisation, du triplet est ajustée pour faire correspondre le plan focal image du système à la sortie du faisceau à l'air. La distance de travail du système, c'est à dire la distance entre le dernier quadrupôle et la position de l'image, est de 235 mm.

Le grandissement théorique de la configuration en triplet d'Oxford est, dans notre cas, de $1/69$ en x (axe horizontal, orthogonal à l'axe optique) et de $1/25$ en y (axe vertical). En pratique, les alimentations des lentilles sont ajustées afin d'avoir un faisceau rond et symétrique avant extraction. Le grandissement final est de l'ordre de $1/20$ dans les deux plans. Typiquement, avec un objet de $5\ \mu\text{m}$ de diamètre, le faisceau peut atteindre environ $300\ \text{nm}$ de diamètre sous vide.

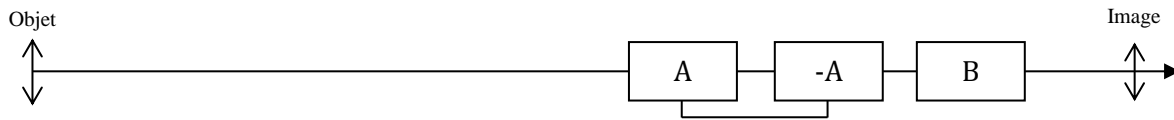


Figure 9 : Configuration en triplet d'Oxford. Les deux premières lentilles quadrupolaires magnétiques sont couplées entre-elles avec des alimentations de polarités opposées. La troisième lentille est alimentée indépendamment des deux autres.

Afin de procéder à l'extraction à l'air du faisceau sans dégrader la fenêtre d'extraction, il est nécessaire de réduire l'intensité du faisceau. Pour cela, un système de collimateurs est présent juste avant les quadrupôles. Ce système permet également de couper les particules diffusées loin de l'axe optique du faisceau et ainsi de limiter les aberrations induites par le système de focalisation. Ces collimateurs coupent une partie du faisceau pour obtenir une intensité finale de $1\ 000$ à $15\ 000$ particules par seconde, selon le collimateur utilisé.

Le faisceau est extrait à l'air au travers d'une fenêtre d'extraction en Si_3N_4 de $150\ \text{nm}$ d'épaisseur (Silson Ltd, Royaume-Uni). Elle est capable de résister au différentiel de pression entre l'air ambiant et le vide de la ligne, tout en restant suffisamment fine pour limiter les perturbations du faisceau d'ions, tant au niveau de l'énergie que de la résolution spatiale.

Juste avant la fenêtre d'extraction, un système de plaques de balayage électrostatique est utilisé pour positionner le faisceau sur la cible. Un déflecteur électrostatique, placé en amont sur la ligne, permet de couper le faisceau en quelques microsecondes après un temps donné sur cible ou, couplé à un système de détection des ions, lorsque le nombre requis de particules a atteint la cible.

1.1.3. L'étage terminal

L'étage terminal correspond à la fin de la ligne, à partir de la chambre d'extraction à l'air du faisceau (cf. Figure 10). Il comprend entre autres le puits de culture où sont situés les échantillons biologiques à irradier. Ce puits de culture est monté sur un porte-échantillons, lui-même placé sur un système de trois platines motorisées, permettant une translation sur trois axes (cf. Figure 10-C). Ce sont des platines micrométriques Newport™ M436 actionnées par des vérins Newport™ LTA-HS. Leur course est de $5\ \text{cm}$ et le pas minimal des vérins est de $0,1\ \mu\text{m}$, avec une vitesse maximale de déplacement de $5\ \text{mm/s}$. La reproductibilité des déplacements, indiquée par le constructeur, est de l'ordre du micromètre. Les axes X et Y correspondent à une translation

dans le plan orthogonal à la direction du faisceau. L'axe Z correspond à un mouvement parallèle à la direction du faisceau (cf. Figure 8).

Un système de microscopie de fluorescence est également présent sur cet étage terminal. Il est constitué d'un microscope commercial inversé (Zeiss AxioObserver™ Z1), positionné horizontalement, de manière à ce que les objectifs soient situés face à la fenêtre d'extraction (cf. Figure 10-C). Ce microscope dispose d'une roue d'objectifs motorisée, permettant d'avoir accès à différents grossissements, ainsi que d'un système de lentilles insérées entre les objectifs et la caméra qui offrent davantage de grossissements sans ajouter de nouveaux objectifs (système Zeiss Optovar™). Il est également équipé d'une caméra CCD (Zeiss AxioCam™ MRm rev. 3) pour l'acquisition d'images. Cette caméra CCD prend des images en noir et blanc avec une définition de 1388 x 1040 pixels, au minimum toutes les 0,4 ms.

La fluorescence est assurée par un système d'illumination à base de LEDs (Zeiss Colibri™ 2). Il est constitué de quatre LEDs, chacune avec une plage de longueurs d'onde d'émission bien définie. En pratique, il permet la visualisation en routine des marquages Hoechst³³³⁴², GFP, RFP (*Red Fluorescent Protein*), DsRed (cf. Tableau 1). Par rapport à un système plus classique basé sur une lampe halogène et sur un système de filtres d'excitation et émission (cubes), ce système présente plusieurs avantages : il ne chauffe pas, ce qui réduit les contraintes mécaniques liées aux variations thermiques, l'extinction et l'allumage des LEDs est de l'ordre de la microseconde, ce qui permet d'effectuer des acquisitions rapides d'images. La réduction drastique de l'utilisation de différents cubes de fluorescence limite les déplacements mécaniques, et accélère également la prise d'images. De plus, la possibilité d'éteindre totalement et instantanément les diodes est un avantage important pour la détection des ions par scintillation (cf. chapitre A-3.2.1).

Tableau 1 : Caractéristiques de différents marquages fluorescents visualisables en routine grâce au système de microscopie installé sur la ligne de micro-irradiation. Les valeurs de longueurs d'onde indiquées ici sont les valeurs où l'excitation/émission est maximale.

Fluorochrome	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission
Hoechst ³³³⁴²	352 nm	455 nm
GFP	470 nm	509 nm
RFP – mCherry	587 nm	610 nm
DsRed	563 nm	581 nm

L'étage terminal est entouré d'une chambre noire (cf. Figure 10-B), conçue pour remplir plusieurs objectifs :

- maintenir les échantillons dans des conditions de température définies (37°C) grâce à un système de régulation en température (OKOLAB™, modèle H201-T1) ;

- assurer une obscurité la plus complète possible, indispensable pour la prise d'images par microscopie de fluorescence et pour l'utilisation de scintillateurs pour la détection des ions (cf. chapitre A-3.2.1).

Le positionnement et la fermeture du faisceau, ainsi que la plupart des composants de l'étage terminal peuvent être contrôlés à distance, via un contrôle-commande décrit au paragraphe A-1.2.

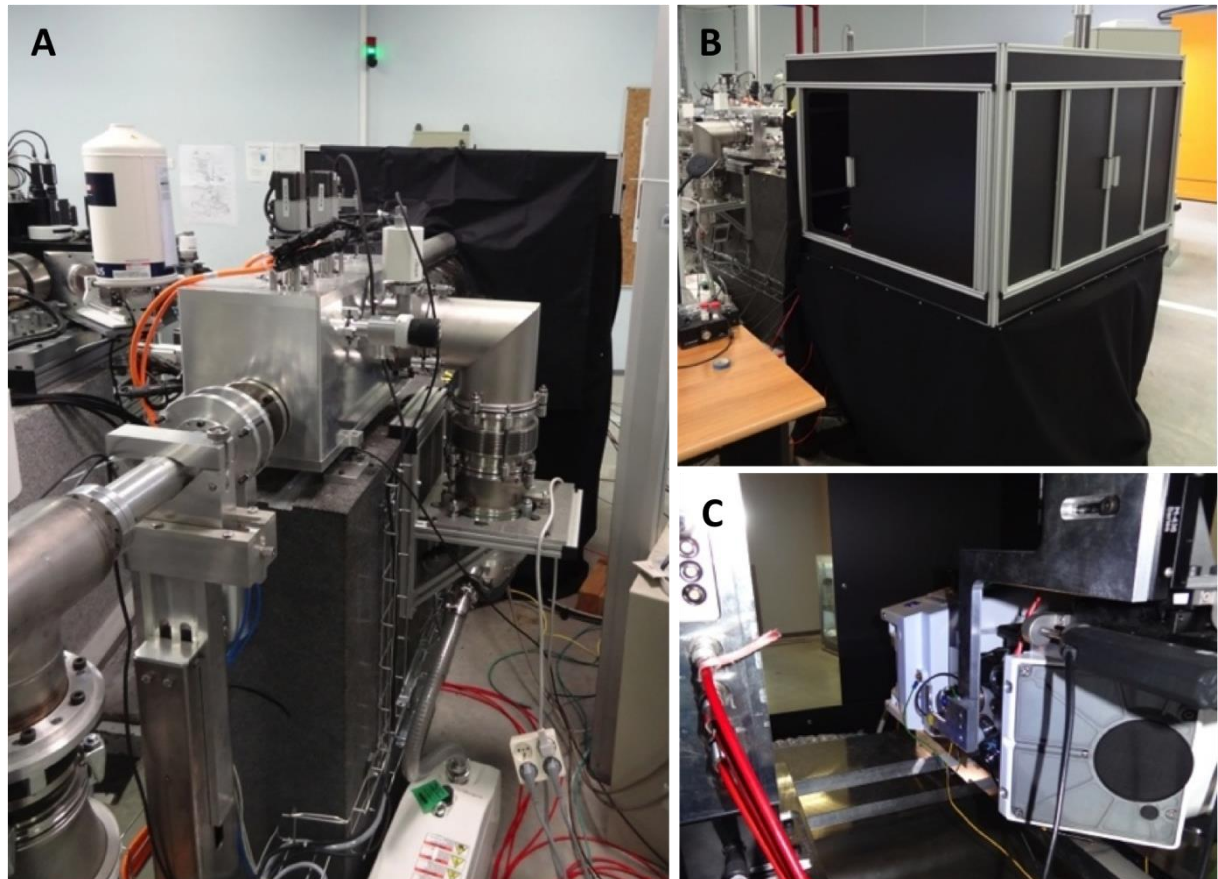


Figure 10 : La ligne de micro-irradiation sur la plate-forme AIFIRA. A : Vue de la ligne au premier plan avec la chambre noire et l'étage terminal au fond. B : Vue extérieure de la chambre noire entourant l'étage terminal. C : Vue de l'intérieur de la chambre, avec le microscope et le porte-échantillon.

1.1.4. Le puits de culture

Un puits de culture spécifique a été développé pour maintenir les cellules dans leur milieu de culture durant l'irradiation et la vidéomicroscopie. Son objectif principal est de s'approcher au mieux des conditions classiques de culture cellulaire, tout en permettant l'irradiation par micro-faisceau. Un schéma du puits de culture est visible sur la Figure 11. Les cellules sont adhérentes à une feuille de polypropylène de 4 μm d'épaisseur (Goodfellow) tendue au moyen d'un anneau sur un support rigide fabriqué en polyétheréthercétone (PEEK). Le support des cellules doit être le plus fin possible afin de ne pas dégrader de manière trop importante la taille du faisceau d'ions et l'énergie des particules incidentes. La face arrière du puits de culture est fermée avec

une lamelle de verre circulaire de 22 mm de diamètre et de 0,17 mm d'épaisseur, qui reste adhérente au puits par la tension de surface du milieu de culture. Le tout est ensuite placé sur le porte-échantillon, puis sur la ligne d'irradiation. L'épaisseur du milieu de culture est limitée à 1 mm pour permettre l'utilisation d'un objectif 63x à longue distance de travail (LD Plan-Neofluar 63x/0.75, Résolution optique d'environ 400 nm, Carl Zeiss MicroImaging GmbH) et pour minimiser la distorsion du chemin optique due à l'indice de réfraction du milieu de culture (Fischer *et al* 2009).

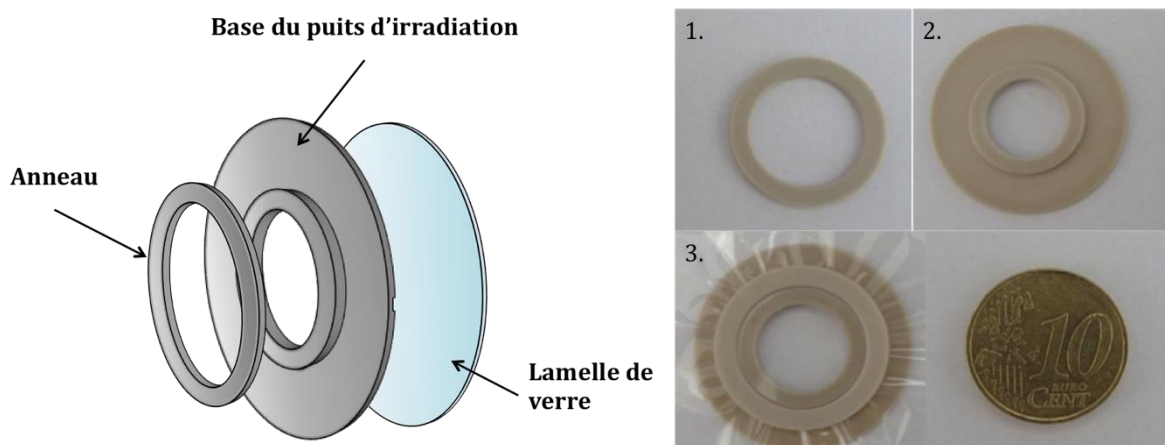


Figure 11 : Représentation schématique du puits de culture pour l'irradiation. Il est constitué d'un anneau (1), utilisé pour tendre une feuille de polypropylène de 4 μ m d'épaisseur sur la base du puits (2 et 3).

Le matériau choisi, le PEEK, est un polymère organique hautement résistant aux variations thermiques (et supporte donc la stérilisation par autoclave). Il est largement utilisé dans les applications biomédicales (implants) et peut être usiné avec précision.

1.2. Contrôle-commande des instruments

Le système d'irradiation est modulaire, constitué de différents éléments indépendants, connectés sur le réseau local de la plate-forme AIFIRA par protocole TCP/IP. Les connexions et communications entre les différents instruments sont résumées dans la Figure 12. La centralisation du contrôle-commande se fait grâce à un PC de contrôle et un logiciel spécifiquement conçu pour piloter la ligne, qui sera décrit dans le chapitre 2.

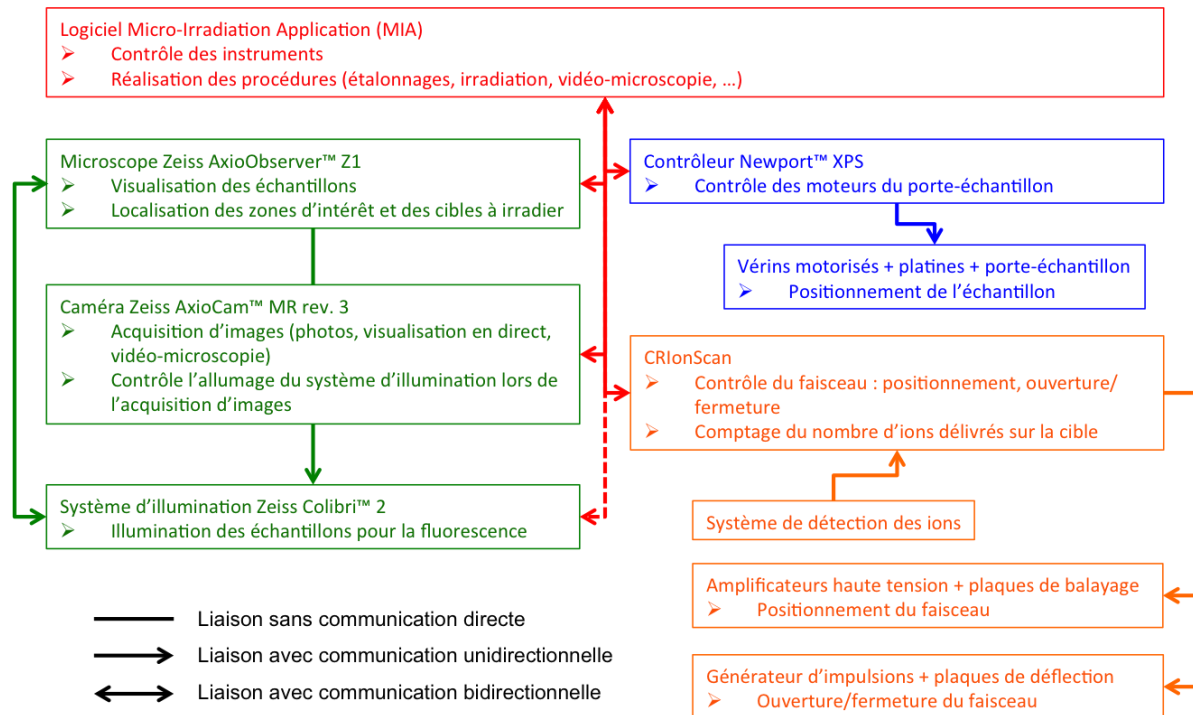


Figure 12 : Représentation schématique des connexions et communications entre les différents instruments liés à la ligne de micro-irradiation. Le logiciel de contrôle-commande et ses connexions associées sont en rouge. L'ensemble d'instruments liés au microscope est en vert. Celui lié au porte-échantillon est en bleu. Celui lié au contrôle du faisceau est en orange. Le logiciel communique ainsi directement avec le microscope, la caméra, le contrôleur des moteurs du porte-échantillon, et le système de contrôle du faisceau. Il communique également indirectement avec le système d'illumination via sa connexion au microscope.

1.2.1. Faisceau d'ions

Le système de contrôle du faisceau (positionnement, déflexion, comptage des particules) est décrit par Daudin *et al* (Daudin *et al* 2013). Nommé « CRionScan », ce dispositif repose sur un système d'entrées/sorties configurables fabriqué par National Instruments (*Compact Reconfigurable Input/Output* – Compact RIO), basé sur une puce FPGA (*Field Programmable Gate Array*), et doté de plusieurs modules d'entrée-sortie ainsi que d'une connectivité Ethernet. La puce FPGA a pour rôle d'interfacer les différents modules tout en assurant une réponse très rapide au niveau des entrées/sorties.

Comme décrit précédemment, le positionnement du faisceau est assuré par des plaques de balayage électrostatique. Deux amplificateurs haute-tension (Physicon Model RS1224-2500) sont chacun reliés à un jeu de plaques métalliques permettant un positionnement horizontal et vertical du faisceau. Un module convertisseur digital-analogique 4 canaux (NI9263) est présent sur le CRionScan afin de générer simultanément des signaux analogiques de basse tension (X, Y, -X, -Y) qui sont ensuite amplifiés. Le module convertisseur présente une résolution temporelle de 10 μ s, la fréquence de balayage maximale est ainsi de 100 000 points/seconde.

L'ouverture/fermeture du faisceau est également assurée par un système de plaques électrostatiques, reliées à un générateur d'impulsions de ± 950 V (DEI PVM-4210). Le temps de montée et

de descente de ces impulsions est inférieur à 15 ns, avec une largeur minimale de 40 ns. Ce générateur est contrôlé par une sortie digitale TTL du CRionScan.

Le comptage d'impulsions TTL issues d'une chaîne de détection est également possible directement via 4 entrées digitales couplées chacune à un compteur. Ainsi, le balayage du faisceau peut être associé à un compteur, et le passage au point suivant est alors conditionné par la détection d'un nombre défini de particules (plus de détails sur la détection dans le chapitre A-3).

Le CRionScan est utilisable via une interface graphique sous la forme d'une page web intégrée au CRionScan. De plus, il peut également être contrôlé par un logiciel client via un échange de messages par Ethernet via le protocole TCP/IP.

1.2.2. Platines motorisées

Les mouvements des platines motorisées sur lesquelles est placé le porte-échantillon sont gérés par un contrôleur de type Newport XPS Motion Controller, contrôlable à distance via Ethernet (protocole TCP/IP). Les platines X et Y sont groupées et peuvent bouger simultanément, la platine Z est indépendante. Leur déplacement est relatif ou absolu, et la vitesse des moteurs est également paramétrable. Le contrôleur est par ailleurs capable de compenser le décalage du déplacement lors d'un changement de direction, dû au jeu mécanique présent à l'intérieur des vérins (phénomène de *backlash*).

1.2.3. Système de microscopie

Le microscope Zeiss AxioObserver™ Z1 est entièrement motorisé et contrôlable à distance. Il est connecté directement au PC de contrôle via Ethernet. Le système d'illumination Colibri™ 2, est également contrôlable à distance en passant par la connexion au microscope. L'interfaçage avec un ordinateur est donc direct et les programmes et bibliothèques fournis par Zeiss permettent un contrôle complet du système via un logiciel client. Le changement d'objectifs, la mise au point et la fluorescence peuvent ainsi être gérés manuellement ou par ordinateur.

2. Le logiciel Micro-Irradiation Application

Afin de regrouper le contrôle des différents instruments de la ligne de micro-irradiation ainsi que les différentes procédures comme la caractérisation du faisceau, le traitement d'images, la reconnaissance de formes, l'étalonnage, et l'irradiation, j'ai contribué au développement d'un logiciel spécifique, en prenant en compte les contraintes liées aux échantillons, et les différents retours d'expérience de l'ancien système, et des campagnes d'irradiation menées sur ce nouveau système. Baptisé « Micro-Irradiation Application » (MIA), ce logiciel est développé sous Microsoft Visual Basic .NET™ (VB.NET) 2008. Par définition, ce langage de programmation orienté objet permet de définir différentes classes correspondant aux instruments et aux procédures

élémentaires. Ces classes sont ensuite intégrées au sein de procédures plus complexes. Le langage de programmation VB.NET est un langage relativement facile à prendre en main et permet de développer des applications complexes avec une interface de type Microsoft Windows™.

Cette partie abordera dans un premier temps l'architecture globale du programme, puis le contrôle des différents instruments de la ligne de micro-irradiation. Nous décrirons ensuite les différentes procédures mises au point. Nous terminerons en insistant sur deux points-clés de ce système : l'irradiation et la vidéomicroscopie.

2.1. Architecture générale

L'application MIA est construite autour d'une fenêtre principale. Cette fenêtre comporte la barre de menus qui permet d'accéder aux fenêtres des instruments et procédures, une barre de raccourcis regroupant les fonctions le plus souvent utilisées, et une barre de statut destinée à informer l'utilisateur sur différents points (positions du porte-échantillons, objectif, optovar et cube de fluorescence en place, statut du faisceau, ...).

Afin de réaliser différentes opérations sans bloquer le programme, nous avons choisi d'utiliser le *multithreading*. Les fonctions et procédures susceptibles de prendre un temps conséquent, ou nécessitant de garder un contrôle absolu du reste du programme sont séparées en différents fils d'exécution (ou *threads*). Chaque fil a ainsi un fonctionnement autonome et l'exécution d'une fonction en son sein ne bloque pas le reste du programme.

2.2. Contrôle des instruments

2.2.1. Faisceau

Comme expliqué dans le paragraphe A-1.2.1, le positionnement ainsi que l'ouverture/fermeture du faisceau sont gérés par le CRionScan. Il communique avec le logiciel par la réception, toutes les secondes, et l'envoi de messages via le protocole TCP/IP. Deux ports sont dédiés à cette communication. L'un pour la réception de messages, l'autre pour l'envoi. Il est aussi possible d'obtenir, à la demande, diverses données du CRionScan comme son statut, ses paramètres, ... Les positions du faisceau sont envoyées au CRionScan sous la forme d'un tableau de points correspondant aux positions des cellules à irradier.

2.2.2. Caméra

La prise d'image se fait à l'aide d'une caméra CCD Zeiss AxioCam™ MRm rev. 3. Celle-ci est connectée à l'ordinateur de contrôle via une connexion FireWire 400. Le contrôle de la caméra se fait au moyen d'un pilote contenant toutes les fonctions nécessaires à l'utilisation de la caméra : réglage du gain, du temps d'exposition, acquisition d'images, ...

La caméra dispose d'une sortie qui délivre un signal TTL. Ce signal, relié au système d'illumination, permet de déclencher l'allumage et l'extinction de la lumière lors de la prise d'images.

2.2.3. Microscope

Le microscope Zeiss AxioObserver Z1 est connecté au PC de contrôle via une connexion Ethernet. Des bibliothèques fournies par Zeiss sont importées dans le programme MIA et permettent un contrôle direct du système. Une fonction est chargée de lire à intervalles réguliers différentes informations depuis le microscope : objectif, Optovar et cube de fluorescence en place, position de la mise au point, ... Le microscope pouvant également être contrôlé manuellement, chaque changement est lu par le logiciel et les différentes fenêtres sont ainsi mises à jour régulièrement.

Le Colibri™ 2 est connecté directement au microscope. La communication se fait donc directement via celui-ci. Il possède deux modes de fonctionnement : un mode manuel, et un mode automatique où l'allumage et l'extinction des diodes est déclenché par le signal TTL issu de la caméra lors de l'acquisition d'images. Ainsi les échantillons sont éclairés seulement lorsque les images sont en cours d'acquisition. Cela permet de réduire leur éclairage au strict minimum, ce qui limite les effets potentiellement néfastes de la lumière (photoblanchiment, ...).

2.2.4. Porte-échantillon

Le contrôleur Newport™ XPS qui gère les platines motorisées du porte-échantillon est connecté au PC de contrôle via le réseau Ethernet. Trois clients TCP/IP sont mis en place dans le programme MIA afin d'effectuer plusieurs actions en parallèle. Un client est dédié à toutes les actions sur les moteurs telles que le paramétrage de leur vitesse, leur initialisation, leur mise à zéro, leur mouvement (absolu ou relatif). Un autre client est chargé de la récupération en continu des positions des moteurs ainsi que d'autres statuts donnés par le contrôleur (statut de l'initialisation, arrêt d'urgence, ...). Le dernier client est destiné à l'arrêt d'urgence des moteurs, afin de pouvoir intervenir à tout moment pour stopper un mouvement involontaire ou « dangereux ».

2.3. Procédures

Au-delà du simple contrôle des instruments de l'étage terminal de la ligne de micro-irradiation, diverses procédures liées à la caractérisation du faisceau, au traitement d'images, à l'irradiation d'échantillons biologiques et à la vidéomicroscopie sont réalisées à l'aide du logiciel MIA.

2.3.1. Caractérisation du faisceau

L'intensité du faisceau ainsi que sa stabilité nécessitent d'être régulièrement contrôlées au cours d'une campagne d'irradiations. Pour effectuer ces contrôles, une photodiode PIN (HAMAMATSU

S1223), placée sur la roue d'objectifs du microscope en lieu et place d'un objectif, peut être aisément placée face au faisceau (plus de détails dans le chapitre A-3.1). Cette photodiode a une efficacité de détection de 100 % aux énergies considérées et le signal en émanant est amplifié et discriminé afin d'obtenir un signal de comptage. Ce comptage est ensuite envoyé au CRionScan, qui le transmet à son tour au programme MIA.

En balayant le faisceau sur un nombre de points et avec un temps par point définis, il est possible d'étudier la statistique du nombre de particules détectées sur chaque point. En construisant un histogramme à partir de ces valeurs, comme illustré par la Figure 13 dans le cas d'un temps par point de 100 ms, l'intensité moyenne du faisceau ainsi que son écart-type peuvent être calculés. Cette information est essentielle dans le cadre d'un contrôle du nombre de particules délivrées par ajustement du temps d'ouverture du faisceau (cf. chapitre A-2.4).

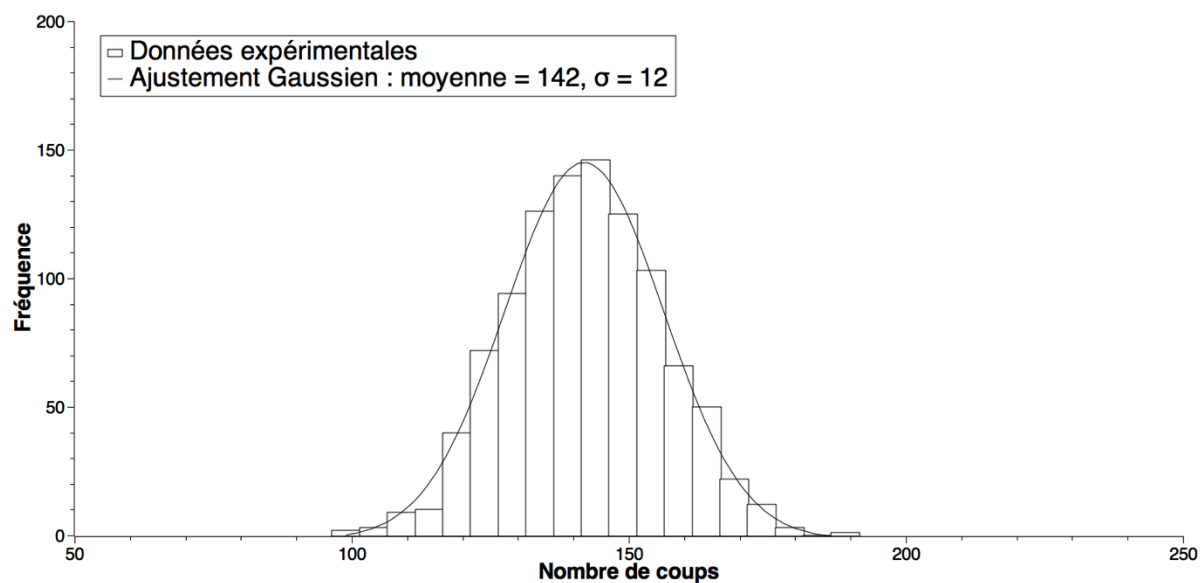


Figure 13 : Exemple d'une distribution du nombre d'ions pour une ouverture du faisceau de 100 ms. Le nombre d'ions extraits à l'air a été mesuré à la position de l'échantillon en utilisant une diode silicium. Dans cet exemple, le nombre moyen de coups est 142 et l'écart-type est 12. La fluctuation relative du nombre d'ions délivrés est donc de 10 %.

2.3.2. Traitement d'images et reconnaissance automatique de formes

Les différents traitements d'image sont possibles au sein même du logiciel MIA grâce à l'utilisation d'interfaces de programmation (*Application Programming Interface*, ou API) du logiciel ImageJ, logiciel open source d'analyse et de traitement d'images (Schneider *et al* 2012).

En plus des différents traitements d'images, les API d'ImageJ permettent de faire de la reconnaissance automatique de formes. Ceci peut être par exemple utilisé afin de reconnaître de manière automatique des noyaux cellulaires à irradier au sein d'un champ de microscope. Pour cela, dans un premier temps, un seuillage de l'image est réalisé. Cela signifie que seuls les pixels ayant une valeur comprise entre les seuils choisis seront reconnus. Ensuite, un critère de taille

des objets à reconnaître est choisi, afin d'éviter que des pixels isolés ou des artefacts de l'image soient reconnus à tort. Une fois les seuils d'intensité et de taille choisis, le programme effectue la reconnaissance de formes et calcule le barycentre de chaque forme reconnue.

2.3.3. Étalonnage du système

L'étage terminal de la ligne de micro-irradiation est constitué d'un système de trois repères indépendants les uns des autres (cf. Figure 14). Un est lié au positionnement du faisceau, contrôlé par les plaques de balayage électrostatiques, et dont l'unité est le volt, un est lié au positionnement de l'échantillon, dont l'unité est le micromètre, et le dernier est lié à l'image de la caméra, dont l'unité est le pixel.

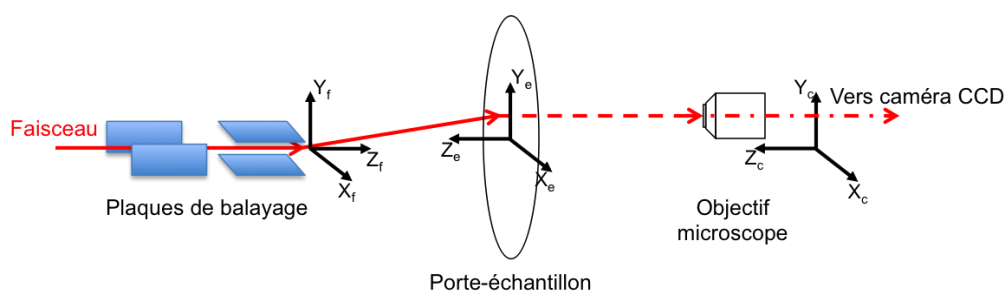


Figure 14 : Représentation schématisée du système de repères de l'étage terminal de la ligne de micro-irradiation.

Pour réaliser des irradiations ciblées d'échantillons biologiques, un bon étalonnage du dispositif est nécessaire. En effet, un alignement précis du faisceau avec la cible à irradier nécessite de connaître la position absolue du faisceau et de la cible et d'établir des correspondances entre les repères associés et celui de l'image CCD. En effet, le repère lié à l'image étant celui visible directement et celui sur lequel sont choisies les cibles à irradier, il est considéré comme référence. Les étalonnages se font donc par rapport à lui. Deux matrices de passage doivent donc être calculées : d'une part entre le repère du porte-échantillon et celui de l'image CCD (pour passer d'une position en pixels à une position en micromètres et inversement) et d'autre part entre le repère du faisceau et celui de l'image CCD (pour passer d'une position en pixels à une position en volts et inversement). L'étalonnage constitue un point critique pour avoir une bonne précision de tir.

Pour l'étalonnage porte-échantillon – image CCD, un objet de référence présent sur le porte-échantillon est choisi par l'utilisateur et centré grossièrement dans le champ de la caméra. L'objet est ensuite déplacé point par point sur un réseau rectangulaire dont le nombre de points est choisi au début de la procédure (3, 4, 9 ou 16). À chaque position, les coordonnées de l'objet de référence sont relevées sur l'image (position en pixels) et grâce aux platines motorisées (position en μm). Lorsque tous les points ont été trouvés, les systèmes suivants sont résolus à l'aide de la méthode du pivot de Gauss et ce pour chaque groupe de trois points :

$$\begin{cases} a \cdot x_{1p} + b \cdot y_{1p} + e = x_{1m} \\ a \cdot x_{2p} + b \cdot y_{2p} + e = x_{2m} \\ a \cdot x_{3p} + b \cdot y_{3p} + e = x_{3m} \\ c \cdot x_{1p} + d \cdot y_{1p} + f = y_{1m} \\ c \cdot x_{2p} + d \cdot y_{2p} + f = y_{2m} \\ c \cdot x_{3p} + d \cdot y_{3p} + f = y_{3m} \end{cases}$$

Où (x_{ip}, y_{ip}) sont les coordonnées en pixels du $i^{\text{ème}}$ point et (x_{im}, y_{im}) les coordonnées en μm du $i^{\text{ème}}$ point. Les coefficients a, b, c, d, e et f constituent alors la matrice de passage des coordonnées en pixels d'un point à ses coordonnées en micromètres :

$$\begin{pmatrix} a & b \\ c & d \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} x_p \\ y_p \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} e \\ f \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_m \\ y_m \end{pmatrix}$$

Lorsque l'étalonnage est réalisé avec plus de 3 points, la valeur médiane de chaque coefficient est choisie. Si trois points sont en théorie suffisants pour obtenir une matrice de passage, l'étalonnage avec davantage de points permet d'éliminer d'éventuels coefficients aberrants dus à une anomalie dans l'étalonnage.

En ce qui concerne l'étalonnage faisceau – image CCD, le faisceau est visualisé directement par le microscope au moyen d'un scintillateur inorganique de type YAG:Ce. La procédure d'étalonnage est similaire : le faisceau doit d'abord être centré grossièrement dans le champ de la caméra. Il est ensuite déplacé point par point selon un réseau rectangulaire du même type que pour l'étalonnage porte-échantillon – image CCD. À chaque position, les coordonnées du faisceau sont relevées sur l'image (position en pixels) et grâce aux tensions appliquées aux plaques de balayage (« position » en V). La matrice de passage des coordonnées en pixels d'un point à ses coordonnées en volts est déterminée en effectuant les mêmes calculs que précédemment, les coordonnées (x_{im}, y_{im}) devenant alors (x_{iv}, y_{iv}) , coordonnées en volts du $i^{\text{ème}}$ point.

Tout choc mécanique au niveau de l'étage terminal de la ligne est susceptible d'entraîner un décalage supplémentaire entre les repères. L'étalonnage doit être régulièrement vérifié, voire renouvelé pour tenir compte de ces décalages, et pour corriger une éventuelle dérive du faisceau. Il faut par conséquent éviter tout choc une fois le système étalonné.

2.3.4. Étalonnage et précision de tir

La précision de tir est définie comme la distance entre le point ciblé et le point réellement irradié par le faisceau. Le choix des cibles à irradier se faisant sur l'image de la caméra CCD, cette précision est fortement conditionnée par la qualité de l'étalonnage entre le repère lié au faisceau et celui lié à l'image.

Tout phénomène conduisant à la distorsion du chemin optique de la lumière arrivant jusqu'à la caméra va induire une dégradation de cette précision de tir en modifiant la position apparente de la cible. Le chemin optique peut être perturbé par plusieurs causes, comme la présence d'un milieu de culture, pouvant induire une réfraction de la lumière, ou un mauvais parallélisme des composants du puits de culture (Fischer *et al* 2009).

Afin de limiter l'impact de ces phénomènes, le puits de culture doit être le plus fin possible, afin de minimiser le chemin optique de la lumière le traversant. Il doit également être usiné avec grande précision pour assurer son parallélisme. De plus, l'étalonnage entre le repère lié au faisceau et celui lié à l'image CCD doit se faire dans des conditions reproduisant au mieux les conditions d'irradiation de l'échantillon.

Le faisceau est visualisé par un cristal de scintillateur inorganique de type YAG:Ce, choisi pour être le plus fin possible (50 μm) afin de réduire son influence sur le chemin optique de la lumière. Il a été également choisi car il est moins fragile qu'un scintillateur inorganique de type NaI, tout en gardant une émission de lumière tout à fait appropriée. En effet, un YAG:Ce de 50 μm d'épaisseur produit 14.10^3 photons par proton de 3 MeV, et 135.10^3 photons par particule α de 3 MeV, ce qui permet une visualisation directe du faisceau par le microscope.

Ce scintillateur peut être placé et maintenu au fond d'un puits de culture entre deux feuilles de polypropylène. Le même puits de culture est utilisé pour la visualisation du faisceau et l'étalonnage, et pour l'irradiation. Ainsi, ce puits « d'étalonnage » peut facilement être adapté aux différentes conditions d'irradiation : dans le cas de l'irradiation de cellules dans leur milieu de culture, le puits d'étalonnage peut facilement être rempli avec de l'eau et fermé par une lamelle de verre, afin de reproduire la même configuration et le même chemin optique ; à l'inverse, pour l'irradiation d'échantillons ne nécessitant pas de milieu de culture, comme des embryons de *C. elegans*, le puits d'étalonnage peut être laissé à l'air.

2.4. Irradiation d'échantillons

Afin de s'adapter aux différents types d'échantillons à irradier (population cellulaire, cellule unique, organisme multicellulaire, ...), plusieurs procédures d'irradiation ont été implémentées dans le logiciel MIA.

Comme expliqué précédemment, le positionnement du faisceau est assuré par les plaques de balayage électrostatique. Ce balayage électrostatique est rapide et précis, et peut couvrir un champ de microscope (jusqu'à 700 μm de côté). Les déplacements plus importants au sein du puits de culture sont assurés par les platines motorisées du porte-échantillon. Ces platines ont une course de 39 mm dans chacune des directions x et y.

Le contrôle du nombre de particules délivrées peut être assuré de deux manières :

- en autorisant le faisceau pendant un temps défini, le nombre de particules étant alors défini par l'intensité du faisceau d'ions ;
- en détectant chaque ion transmis, le faisceau reste alors en position jusqu'à ce que le nombre de particules choisi ait été atteint, puis passe au point suivant.

2.4.1. Irradiation en réseau

C'est le mode d'irradiation le plus simple car il ne nécessite pas d'étalonner le dispositif. C'est une méthode qui permet d'irradier rapidement des échantillons. L'irradiation est réalisée selon un réseau centré sur la position initiale du faisceau. Ce réseau est paramétrable : le nombre de lignes et de colonnes, ainsi que l'espacement entre chaque point, sont choisis par l'utilisateur. De plus, le motif de chaque point du réseau peut également être défini : point, ligne horizontale ou verticale, croix, réseau.

2.4.2. Irradiation ciblée d'un champ microscope

Ce mode d'irradiation est plus complexe et nécessite que le système soit étalonné. Une image du champ que l'on veut irradier est capturée et une ou plusieurs cibles sont choisies sur cette image, que ce soit par reconnaissance automatique ou manuelle. Là aussi, les cibles peuvent être irradiées avec différents motifs : point, ligne horizontale ou verticale, croix, réseau. Lors de l'irradiation, la cible la plus proche du centre de l'image est ciblée en premier, puis de proche en proche jusqu'à ce que toutes les cibles aient été irradiées, et ce afin d'optimiser les mouvements du faisceau ou du porte-échantillon.

2.4.3. Irradiation de plusieurs champs

Ce mode d'irradiation regroupe la totalité des types d'irradiation possibles. La particularité de ce mode est la possibilité de traiter plusieurs champs adjacents dans un même puits de culture, via une mosaïque. Cette mosaïque est paramétrable (nombre de champs, recouvrement, ...) et la procédure peut être manuelle ou automatique. Pour chaque champ de la mosaïque, le porte-échantillon se met en place, une image est prise par la caméra, la reconnaissance automatique des cellules ou noyaux est réalisée le cas échéant, et des cibles sont éventuellement supprimées et/ou rajoutées par l'utilisateur. L'irradiation faite, le système passe au champ suivant. Cette procédure permet de couvrir automatiquement la totalité d'un puits de culture pour irradier rapidement un grand nombre d'échantillons. Cependant, dans le cadre de l'irradiation ciblée de plusieurs champs de manière automatique, il n'est pas possible d'ajouter/supprimer des cibles manuellement entre chaque champ. Tout repose donc sur les paramètres de reconnaissance automatique de forme, et peut donc conduire à des cellules non irradiées.

2.5. Vidéomicroscopie en ligne

Une des originalités de cette ligne de micro-irradiation est la possibilité de faire de la vidéomicroscopie en ligne. Cet outil consiste en une prise automatique d'images pendant une plage de temps donnée, et avec un intervalle défini. Cette vidéomicroscopie est également multi-fluorescence. En effet, il est possible, à chaque intervalle, de prendre une image pour chaque fluorochrome (GFP, RFP, Hoechst³³³⁴², ...). L'utilisateur peut ainsi choisir quels types de fluorescence il veut enregistrer et leur associer un temps d'exposition qui peut être différent pour chaque marqueur.

L'emploi du Colibri2 pour une illumination instantanée et spécifique de l'échantillon permet ici de raccourcir au maximum l'intervalle entre la capture d'images avec différents types de fluorescence, rendant possible une prise rapide d'images. Le seul facteur limitant reste alors le temps d'exposition nécessaire pour avoir une image de bonne qualité.

La vidéomicroscopie est indépendante de l'irradiation, et cette dernière peut donc avoir lieu pendant l'acquisition d'images. Ceci permet de visualiser en temps réel l'échantillon avant, pendant, et après irradiation. De plus, si nous voulons procéder à l'irradiation de l'échantillon à un moment précis (lors d'une phase du cycle cellulaire spécifique par exemple), il est ici possible de cibler et d'irradier l'échantillon précisément au moment voulu.

3. Développement de systèmes de détection des ions délivrés

Afin de pouvoir quantifier avec précision la dose délivrée au sein des échantillons irradiés, il est nécessaire de connaître le nombre de particules délivrées lors de l'irradiation. Deux méthodes peuvent être utilisées sur la ligne microfaisceau.

La première méthode se base sur l'évaluation de l'intensité du faisceau avant l'irradiation, et le contrôle du nombre de particules se fait en contrôlant le temps d'ouverture du faisceau. La Figure 13 représente une distribution typique du nombre de protons détectés par la photodiode pour un temps d'ouverture du faisceau de 100 ms. Dans ce cas particulier, le nombre moyen de protons détectés est de 142 ± 12 . La dispersion des résultats est alors purement statistique, avec une incertitude correspondant à l'écart-type d'une distribution de Poisson, $\sigma = \sqrt{N}$, où N est le nombre moyen de coups détectés.

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir travailler avec un faisceau de diamètre et d'énergie préservés. En effet, dans ce cas, les seuls matériaux traversés par les ions sont la fenêtre d'extraction, une couche résiduelle d'air, et le support des échantillons (une feuille de polypropylène de 4 μm d'épaisseur), ce qui limite la dispersion spatiale du faisceau et la dégradation de l'énergie des particules. Par ailleurs, le contrôle du temps d'ouverture du faisceau ne

demande pas de chaîne de mesure spécifique, puisqu'il est directement implémenté dans le programme MIA et dans le CRionScan. Son utilisation est donc plus simple. Ce mode présente un intérêt certain pour la micro-irradiation d'échantillons où l'objectif est de générer des dommages dans une zone très localisée. Toutefois, le contrôle du nombre de particules en contrôlant le temps d'ouverture du faisceau nécessite une intensité de faisceau parfaitement stable dans le temps, sous peine d'une irradiation avec un nombre erroné de particules.

Dans le cas d'un faible nombre de particules, l'incertitude sur ce nombre devient trop importante, et l'utilisation de systèmes de détection s'avère alors indispensable, ceux-ci devant avoir une efficacité de détection proche de 100%. En fonction du type d'échantillons irradiés, de la nécessité ou non de les maintenir dans un milieu de culture, et des ions considérés, la détection peut se faire en aval ou en amont du puits de culture. Cette partie a pour objectif la description des différentes méthodes de détection mises au point.

3.1. Détection en aval de l'échantillon

La détection des particules en aval de l'échantillon se fait à l'aide d'une photodiode PIN (Hamamatsu S1223). En effet, les caractéristiques de la jonction PIN (Positive-Intrinsèque-Négative), permettent la détection de particules chargées via l'obtention d'un signal compatible avec le comptage. De plus, la zone de déplétion de la photodiode choisie est telle que les particules considérées déposent toute leur énergie en son sein, ce qui permet une efficacité de détection de 100%.

Une fois débarrassée de sa vitre de protection, qui peut arrêter les particules avant qu'elles n'atteignent la zone semi-conductrice, la photodiode PIN est montée sur un support en plastique, conçu pour être positionné à la place de l'un des objectifs sur la roue motorisée du microscope. Son emplacement permet de la positionner facilement face au faisceau. Une procédure a été mise en place dans le logiciel de contrôle-commande pour basculer automatiquement la roue des objectifs à la position de la photodiode pendant l'irradiation (cf. Figure 15). Après l'irradiation, l'objectif utilisé pour le ciblage revient en place avec la mise au point de départ. Ceci est particulièrement intéressant lorsque l'irradiation et l'acquisition d'images en vidéomicroscopie se font en parallèle car il n'est alors pas nécessaire d'interrompre l'acquisition pour procéder à l'irradiation.

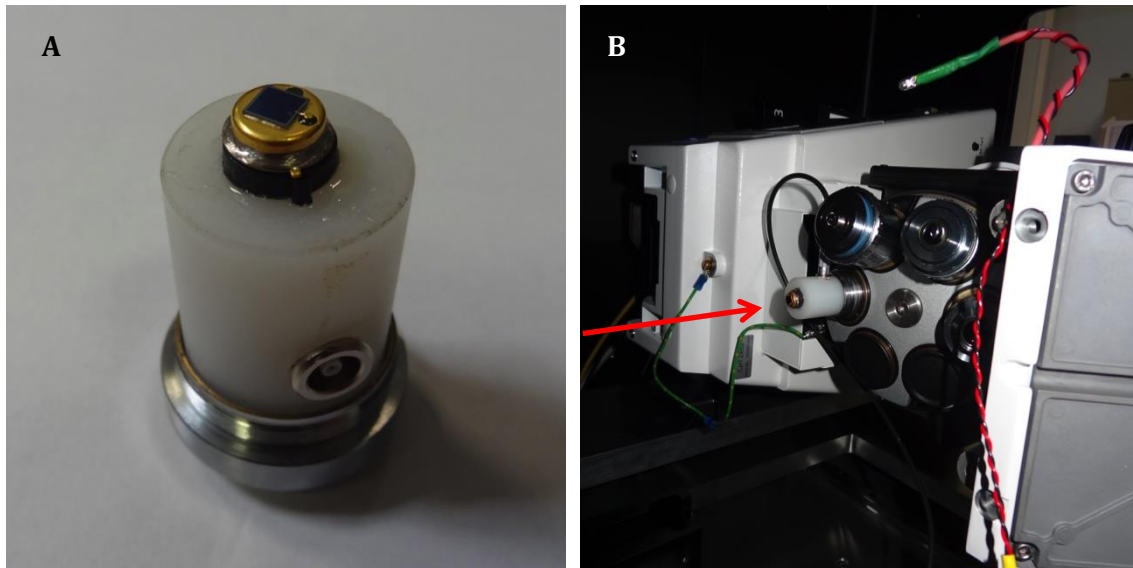


Figure 15 : Photodiode PIN montée sur son support. (A) La connectique est située à l'intérieur du support et le tout est relié à la chaîne d'acquisition via un connecteur LEMO. (B) Le support est conçu pour être placé sur la roue des objectifs du microscope. La flèche rouge représente le faisceau d'ions.

Ce mode de détection présente lui aussi l'avantage de pouvoir travailler avec un faisceau de diamètre et d'énergie préservés, puisqu'il ne traverse qu'un minimum de matière avant d'atteindre la cible. Néanmoins, la détection des particules après l'échantillon n'est possible que dans un cas bien particulier : le parcours des particules doit être suffisant pour pouvoir atteindre la photodiode, placée directement derrière l'échantillon. Ceci est possible avec certains types d'échantillons multicellulaires comme le nématode *C. elegans*, qui est suffisamment fin et ne nécessite pas de présence de milieu de culture pour survivre (plus de détails dans les chapitres B-3 et F)

Les échantillons cellulaires nécessitent un milieu de culture afin de les maintenir dans de bonnes conditions physiologiques. Or, dans le cas de particules légères de quelques MeV, le parcours dans la matière est très limité (quelques dizaines de micromètres). Le seul moyen de détecter les particules après l'échantillon est alors d'enlever le milieu de culture lors de l'irradiation, comme cela se pratique sur certaines installations (Randers-Pehrson *et al* 2001, Konishi *et al* 2013). Toutefois, lorsque les cellules doivent être observées en ligne sur des périodes relativement longues, durant et après l'irradiation (quelques dizaines de minutes), la présence de milieu de culture est souhaitable, et l'utilisation de détecteurs en transmission situés en amont de l'échantillon est la seule solution.

3.2. Détection en amont de l'échantillon

Afin de ne pas dégrader de manière trop importante la taille et l'énergie du faisceau, le système de détection doit être le plus mince possible, tout en gardant une efficacité de détection proche de 100%. Deux types de systèmes de détection ont été étudiés pour la ligne microfaisceau.

3.2.1. Détecteur à scintillation

Pour la détection des protons, le meilleur compromis entre efficacité, taille et simplicité d'utilisation est l'utilisation de scintillateurs plastiques. Ils sont utilisés sur d'autres lignes d'irradiation par faisceau d'ions utilisant des ions légers (Folkard *et al* 1997a, Greif *et al* 2004, Khodja *et al* 2009). Dans la plupart des cas, la lumière émise par le scintillateur lors du passage d'un ion est collectée, au travers du puits de culture, par un photomultiplicateur installé à la place d'un objectif du microscope.

Ce type de détecteur nécessite une obscurité totale afin de limiter le plus possible le bruit issu de sources de lumière parasite. La chambre obscure placée autour de l'étage terminal de la ligne a été conçue dans ce but. Toutefois, dans notre cas, la lumière émise par le scintillateur est faible, ce qui implique de devoir fortement polariser le photomultiplicateur pour augmenter le gain, entraînant une augmentation importante du bruit, et la dégradation du rapport signal/bruit. L'utilisation de deux photomultiplicateurs branchés en coïncidence permet d'éliminer 99% du bruit de fond, et améliore donc grandement le rapport signal/bruit.

Parmi les différents scintillateurs plastiques disponibles, le BC400 (St-Gobain Crystals) nous a paru le plus adapté, et ce pour plusieurs raisons. Premièrement, il est facilement disponible sous forme de films minces, jusqu'à 10 μm d'épaisseur. Deuxièmement, son rendement lumineux est parmi les meilleurs pour les ions considérés. Ainsi, il est capable d'émettre 13 photons par keV déposé ce qui, pour un proton de 3 MeV traversant un film de 10 μm d'épaisseur, équivaut à une émission de 1950 photons.

Ces photons doivent cependant atteindre les photomultiplicateurs pour être détectés. Pour maximiser l'efficacité de détection, l'utilisation d'un guide de lumière s'est avéré indispensable afin d'amener un maximum de photons vers les deux photomultiplicateurs. Le matériau typiquement utilisé dans ce cas est le plexiglas. La géométrie du guide de lumière dans notre cas a été pensée d'une part pour pouvoir d'adapter sur la chambre d'extraction du faisceau d'ions, et d'autre part pour guider au mieux les photons. De plus, le guide de lumière est recouvert de peinture réfléchissante (St-Gobain BC-622A) afin de maximiser la réflexion des photons émis par le BC400 au passage des protons. Les deux photomultiplicateurs (Hamamatsu R7400P) sont ensuite placés directement sur le guide de lumière.

Nous avons, dans notre cas, utilisé les feuilles de BC400 les plus minces disponibles, soit une épaisseur de 10 μm . Le BC400 est placé sur le guide de lumière au niveau de la sortie du faisceau, qui est un trou de 0,5 mm de diamètre. La tenue mécanique au vide est assurée par une feuille de Mylar aluminisé de 2 μm d'épaisseur, qui est collée par-dessus la feuille de BC400. Le

faisceau, lors de son extraction à l'air, traverse donc d'abord le scintillateur, puis la feuille de Mylar. Le principe du dispositif est présenté sur la Figure 16.

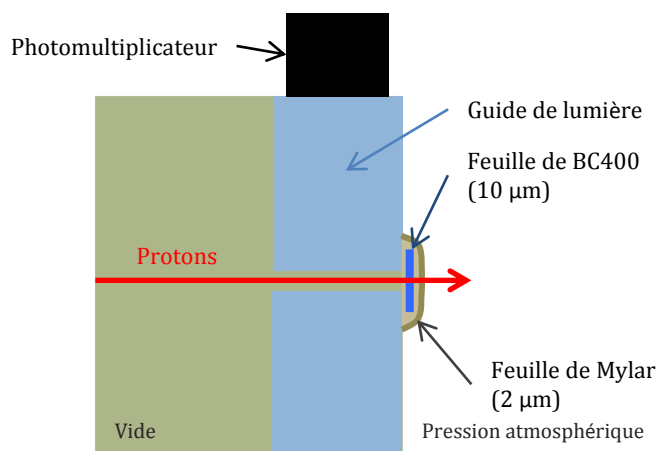


Figure 16 : Représentation schématique de l'extraction du faisceau avec le système de détection à scintillation.

3.2.2. Détecteur d'électrons secondaires

Le système de détection envisagé pour la détection des particules α est un détecteur d'électrons secondaires. Ce type de détecteur est utilisé à GSI, pour la détection d'ions lourds énergétiques (Heiss *et al* 2006). Le principe repose sur la détection, par un multiplicateur d'électrons (channeltron), des électrons émis par un matériau mince, déposé sur la fenêtre d'extraction, lors du passage du faisceau. Le système est schématisé sur la Figure 17.

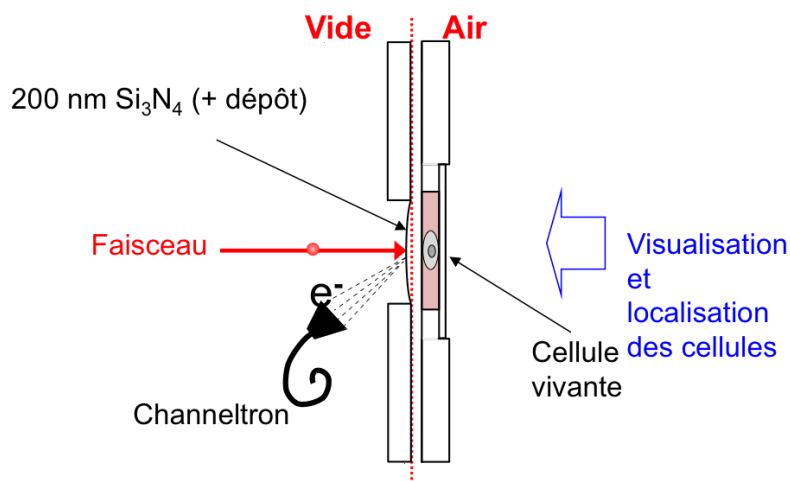


Figure 17 : Représentation schématique du système équipé d'un détecteur d'électrons secondaires. Le faisceau d'ions (en rouge), lorsqu'il traverse la fenêtre d'extraction, arrache des électrons à sa surface. Les électrons entrant dans le channeltron sont ensuite amplifiés et le signal obtenu est envoyé dans une chaîne d'acquisition.

Le channeltron (Philips XL951B) est alimenté en plusieurs points (tête et queue) pour la collection et l'amplification des électrons secondaires. Un système de grille de polarisation a été mis

en place à l'entrée du multiplicateur d'électrons afin d'améliorer la collecte des électrons. Le tout est placé dans une enceinte métallique afin d'optimiser les lignes de champ pour conduire les électrons émis par la fenêtre d'extraction vers l'entrée du channeltron. L'enceinte et les lignes de champ sont représentées sur la Figure 18. Les polarisations appliquées aux différentes parties du système sont également données sur cette figure.

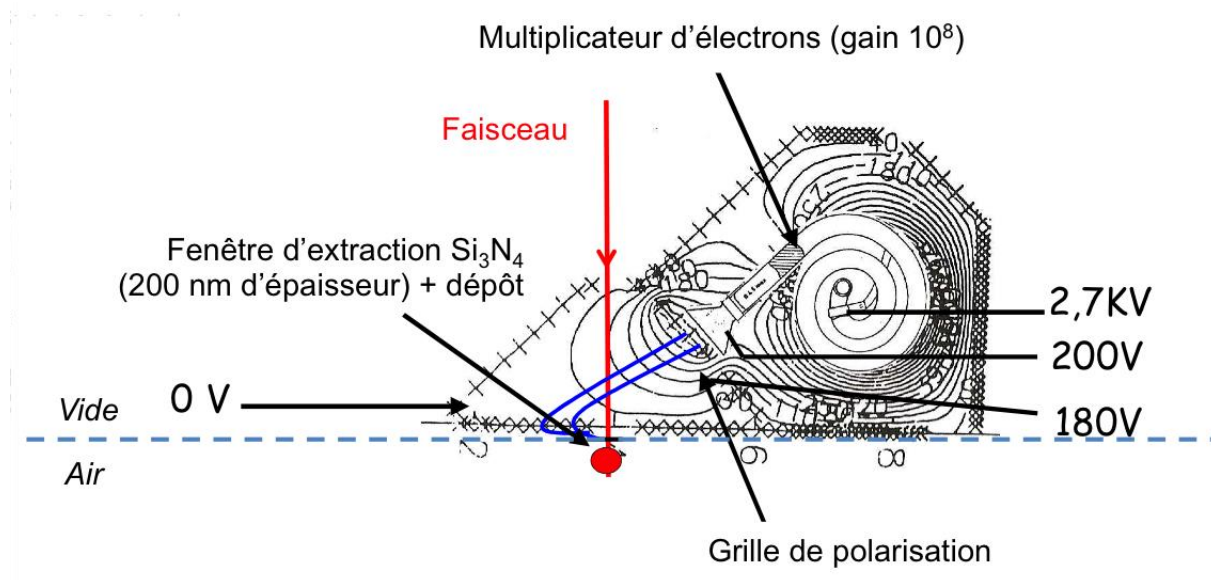


Figure 18 : Channeltron dans son enceinte métallique. Les lignes de champ présentes dans cette enceinte sont également représentées. La grille de polarisation est polarisée à 180 V, la tête du multiplicateur d'électrons à 200 V, et sa queue à 2,7 kV. Les lignes bleues représentent le trajet d'électrons issus de la fenêtre d'extraction. Ils sont guidés vers le channeltron par les lignes de champ.

3.2.3. Mesure de l'efficacité de détection

L'efficacité de détection des systèmes en transmission, est mesurée relativement à celle de la photodiode PIN, placée face au faisceau, dont l'efficacité de détection est de 100% pour des ions dans le domaine du MeV. Le comptage simultané des particules avec la photodiode et l'un des systèmes de détection en transmission étant possible, l'efficacité de détection peut donc être mesurée en comparant les taux de comptage associés aux deux systèmes.

4. Caractérisation du faisceau : Irradiation de détecteurs solides de traces

Afin d'évaluer rapidement les différentes caractéristiques du faisceau d'ions, comme sa taille, la précision de son positionnement, et la précision de tir du système, une méthode simple à mettre en œuvre est l'utilisation de détecteurs solides de traces de type CR39 (Peng *et al* 2001). Ces détecteurs se présentent sous la forme de feuilles de polymère solide de 500 μm d'épaisseur. Le passage d'une particule chargée dans ce polymère fragilise la structure de celui-ci tout au long de la trace. Une attaque chimique à l'hydroxyde de potassium (KOH) à 80°C permet alors de révéler ces traces, qui peuvent alors être observées en microscopie. La durée de l'attaque chimique

dépend du type de particule utilisé pour l'irradiation : 5 minutes dans le cas de particules α de 3 MeV, 15 minutes dans le cas de protons de 3 MeV.

Plusieurs mesures peuvent être réalisées sur ce type de détecteurs. Ainsi, l'irradiation selon un motif régulier de points permet de juger de la reproductibilité du positionnement du faisceau avec les plaques de balayage électrostatique. Plusieurs particules pouvant être déposées sur chaque point, la taille du faisceau peut également être évaluée.

Par ailleurs, le CR39 peut également être utilisé pour évaluer la précision de tir de notre système. Une méthode similaire à celle utilisée par Peng *et al* et Heiss *et al* (Heiss *et al* 2006) a pour cela été utilisée. Le détecteur de traces est irradié en deux temps. Une première irradiation avec des particules α de 3 MeV est réalisée dans un premier temps sur plusieurs points. Le CR39 subit ensuite une première attaque chimique. Les points ainsi révélés sont ensuite utilisés comme cibles pour une seconde irradiation. Celle-ci est faite suivant un motif en croix de 5 points et de 20 μm de large, puis le détecteur de traces est à nouveau révélé par attaque chimique. La mesure de la distance entre le point-cible, plus large car il a subi deux attaques chimiques, et le centre de la croix permet alors d'évaluer la précision de tir du système.

B – IRRADIATION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES VIVANTS

Afin de valider la ligne pour diverses applications, et pour mettre au point les méthodologies comme la vidéomicroscopie, nous avons procédé à l'irradiation de différents types d'échantillons.

1. Irradiation de cellules et immunodétection

Afin de visualiser les conséquences biologiques des dommages ADN par faisceau d'ions, nous avons procédé à l'irradiation selon un réseau régulier et à l'irradiation ciblée de cellules vivantes. Après irradiation, nous avons utilisé l'immunodétection afin de visualiser les modifications radio-induites de protéines impliquées dans la réponse aux dommages ADN.

Les cellules utilisées sont des cellules de la lignée HeLa CCL2, obtenues à partir de l'ATCC (*American Type Culture Collection*) et maintenues en culture au laboratoire.

1.1. Préparation des cellules pour l'irradiation

Les cellules sont irradiées dans un puits de culture spécifique, présenté dans le chapitre A-1.1.4, placé verticalement en face de la fenêtre d'extraction du faisceau. Elles sont adhérentes à la membrane de polypropylène, ce qui permet leur visualisation et leur irradiation. Pour faciliter cette adhésion, la membrane de polypropylène est traitée au CellTak, puis les cellules sont ensemencées dans le puits 24h avant irradiation. Lors de la procédure d'irradiation, les cellules sont maintenues dans un milieu de culture (DMEM 1 g.L⁻¹ glucose sans rouge de phénol, complété avec 10% (v/v) de sérum fœtal de veau, et de 2,5 mM de L-glutamine). Le puits de culture est fermé par une lamelle de verre de 22 mm de diamètre et de 0,17 mm d'épaisseur et le tout est placé dans un support spécifique et mis en position sur la ligne d'irradiation. Ces étapes sont présentées sur la Figure 19.

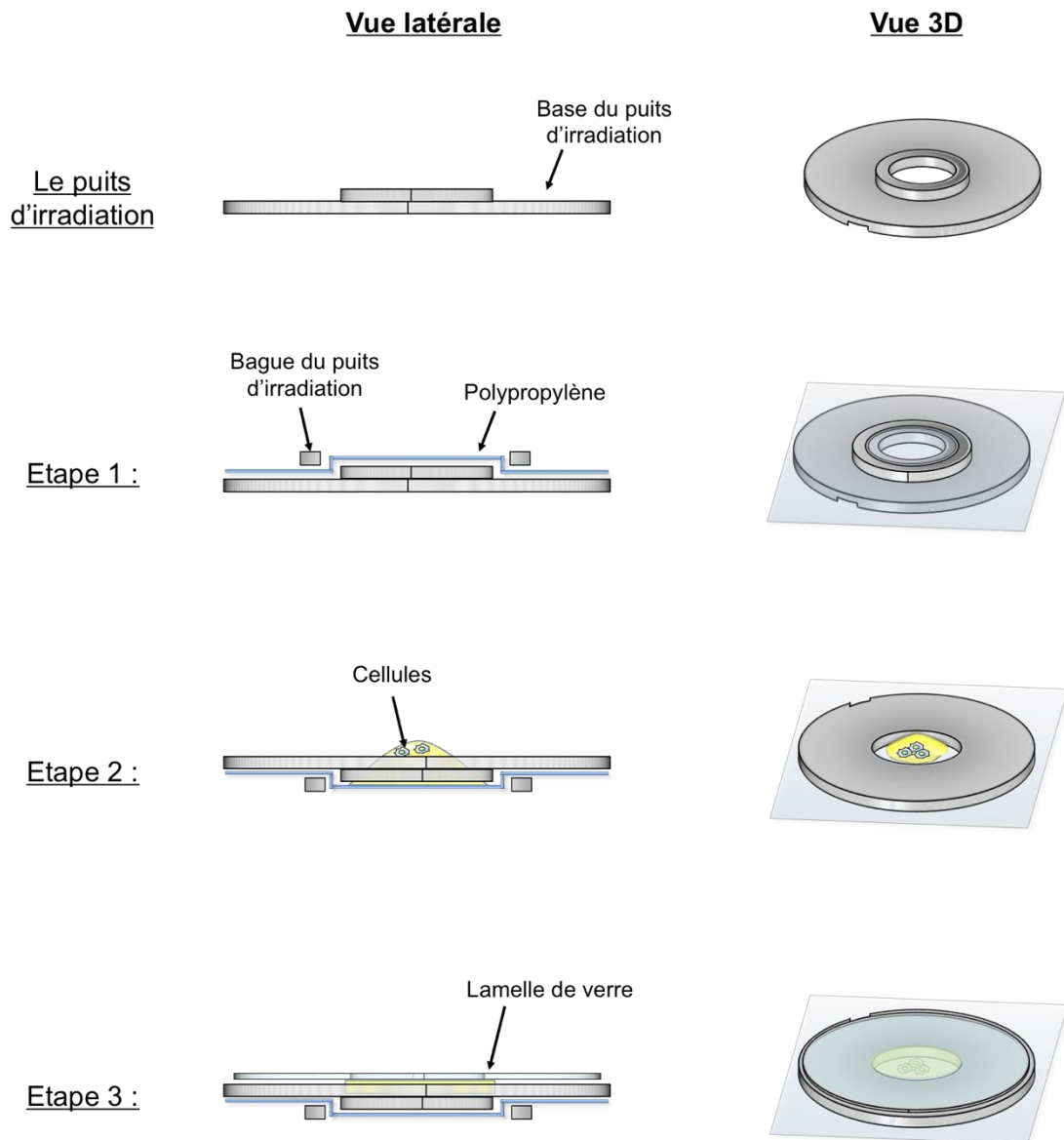


Figure 19 : Montage du puits de culture pour l'irradiation de cellules. Une feuille de polypropylène de 4 μm d'épaisseur est tendue sur la base du puits de culture au moyen de la bague de fixation, puis traitée au CellTak. Les cellules sontensemencées au moins 24h avant irradiation. Juste avant irradiation, le puits est rempli de milieu de culture frais et fermé à l'aide d'une lamelle de verre de 22 mm de diamètre et de 0,17 mm d'épaisseur.

1.2. Irradiation

Les cellules ont été irradiées selon deux modes : l'irradiation en réseau, qui permet d'irradier rapidement un grand nombre de cellules au sein d'un puits de culture avec une dose homogène à l'échelle de la population cellulaire, et l'irradiation ciblée, qui permet d'irradier spécifiquement un compartiment subcellulaire défini (ici, le noyau).

1.2.1. Irradiation en réseau

L'irradiation en réseau a été réalisée de manière automatique, grâce à la procédure décrite dans le chapitre A-2.4.3. Elles ont été irradiées avec des particules α suivant un réseau de lignes séparées de 15 μm constituées de points séparés de 5 μm .

1.2.2. Irradiation ciblée

Afin d'irradier les noyaux des cellules de manière ciblée, il est nécessaire de visualiser ces noyaux en microscopie à fluorescence. Plusieurs méthodes sont utilisables pour cela : l'utilisation d'agents intercalants pour marquer la molécule d'ADN, comme le Hoechst³³³⁴², ou l'utilisation de techniques de génie génétique permettant, par transfection, de coupler certaines protéines d'intérêt, comme l'histone H2B, avec des marqueurs fluorescents de type GFP.

Nous avons procédé à l'irradiation ciblée de noyaux de cellules HeLa marquées au Hoechst³³³⁴² en utilisant la procédure d'irradiation de plusieurs champs adjacents du chapitre A-2.4.3 en mode manuel. Dans chaque champ, les noyaux ont été reconnus automatiquement par traitement d'image, avec une correction manuelle en cas de mauvaise reconnaissance. Chaque noyau a été irradié avec des protons de 3 MeV selon un motif en croix de 5 points de 10 μm de large.

1.3. Immunodétection

Les rayonnements ionisants sont connus pour endommager la molécule d'ADN de manière directe via la formation de cassures simple- et double-brin, et de manière indirecte via la formation d'espèces radicalaires. Les cassures ADN double-brin, issues des dommages directs, entraînent une phosphorylation de l'histone H2AX par la protéine ATM. L'immunodétection des formes phosphorylées de ces protéines peut alors permettre de visualiser les zones endommagées de l'ADN.

Lorsque l'irradiation est terminée, le puits de culture est ouvert en conditions stériles. Le milieu de culture est remplacé par du milieu frais et le puits est placé à 37°C, 5% CO₂, en atmosphère humide. Après 2h d'incubation, les cellules sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde 3% w/v, pH7,4 (Sigma) pendant 30 min à 4°C. Les cellules sont ensuite perméabilisées, et reçoivent une solution d'anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt. Les cellules sont incubées une nuit à 4°C en présence de la solution d'anticorps primaires. Les puits sont ensuite rincés trois fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation dans du tampon de perméabilisation. Les cellules sont enfin incubées avec l'anticorps secondaire, qui est lui dirigé contre l'anticorps primaire et est fluorescent.

L'ensemble de ces traitements se déroule au sein même du puits d'irradiation, les cellules HeLa irradiées étant toujours adhérentes au polypropylène. À l'aide d'un emporte-pièce, la feuille de

polypropylène est délicatement découpée puis montée entre lame et lamelle dans une goutte de milieu de montage *Prolong Gold antifade Reagent* (Molecular Probes, Life Technologies). Les lames sont conservées une nuit à température ambiante à l'abri de lumière puis à 4°C jusqu'à observation au microscope.

Les échantillons ont été observés au laboratoire avec un microscope à épifluorescence inversé (Zeiss AxioObserver™ Z1) équipé d'un objectif 63x à immersion à huile. D'autres acquisitions d'images ont été faites au Bordeaux Imaging Center (BIC, Université de Bordeaux II), à l'aide du microscope confocal Leica TCS SP8 équipé d'un objectif 63x/1,4 à immersion à huile.

2. Micro-irradiation à l'échelle cellulaire et vidéomicroscopie

Si l'immunodétection permet de visualiser un grand nombre de protéines liées à la réponse biologique à l'irradiation, elle ne constitue qu'une photographie à l'instant t de l'échantillon après irradiation. L'utilisation de techniques de vidéomicroscopie permet d'obtenir des données dynamiques pour une protéine donnée, et ce quelques secondes après irradiation.

2.1. Les protéines d'intérêt

Pour caractériser l'irradiation par microfaisceau d'ions, nous avons besoin d'une réponse biologique rapide. Le couplage avec la vidéomicroscopie, permet d'aller plus loin qu'avec les techniques d'immunodétection. Par ailleurs, afin de mettre au point nos protocoles d'irradiation et d'acquisition, il est nécessaire de disposer d'une protéine qui répond facilement à l'exposition aux rayonnements ionisants, qui est rapide, et qui peut être couplée à un fluorochrome pour la microscopie de fluorescence. Nous avons choisi la protéine XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing group 1*). Elle joue un rôle central dans un grand nombre de mécanismes de réparation de l'ADN, comme la réparation par excision de base (BER), ou la réparation des cassures simple-brin de l'ADN (Brem and Hall 2005, Caldecott 2003, Mortusewicz and Leonhardt 2007).

Des cellules HeLa ont été transfectées* de manière transitoire pour exprimer cette protéine couplée à la GFP. XRCC1-GFP est exprimée dans le noyau cellulaire de manière uniforme (cf. Figure 20). Elle permet donc de visualiser les noyaux cellulaires et de les cibler pour l'irradiation par faisceau d'ions. Par ailleurs, son intérêt principal dans notre étude est sa capacité à venir se relocaliser sur les sites ADN endommagés, et ce quelques secondes seulement après irradiation (Mortusewicz and Leonhardt 2007).

* La transfection consiste à introduire un ADN étranger au sein de cellules cultivées *in vitro*, généralement pour leur faire exprimer un gène donné. Cela peut conduire par exemple à l'expression d'une protéine couplée à un marqueur fluorescent (histone H2B-GFP, protéine XRCC1-GFP, ...).

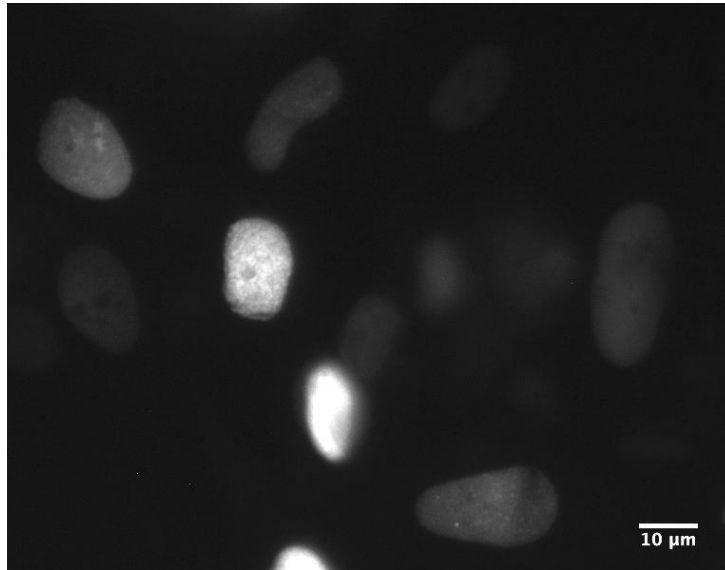


Figure 20 : Visualisation de noyaux de cellules HeLa exprimant la protéine XRCC1-GFP avec le microscope présent sur la ligne microfaisceau. Un objectif 63x a été utilisé.

Cette protéine a été utilisée sur plusieurs aspects de ces travaux. Premièrement, sa capacité à se relocaliser sur les sites endommagés juste après l'irradiation permet de visualiser directement les conséquences de l'irradiation, sans avoir recours à l'immunodétection. Il est donc possible de savoir directement si le noyau cellulaire a été irradié, et la précision de tir sur cellules est directement mesurable. Deuxièmement, le recrutement de cette protéine peut être visualisé par vidéomicroscopie, permettant de mesurer la cinétique de relocalisation. La méthode de mesure mise au point en utilisant la protéine XRCC1-GFP est expliquée plus en détails dans le chapitre B-4.1.

Le groupe IPCV est également impliqué dans la modélisation de l'interaction rayonnements ionisants – vivant et, au travers de la collaboration Geant4-DNA (Incerti *et al* 2010), cherche notamment à caractériser les dommages ADN indirects radio-induits. Si un certain nombre de travaux ont été réalisés en utilisant les UV, la caractérisation de ces dommages par micro-irradiation par faisceau d'ions est inédite. Dans ce cadre, nous avons considéré l'enzyme OGG1 (*8-oxoG ADN-glycosylase*), impliquée dans l'excision de la base oxydée 8-oxoG, produit majoritaire de l'oxydation de bases par des espèces réactives oxygénées créées par les rayonnements ionisants. Des cellules HeLa transfectées pour exprimer OGG1 couplée à la GFP expriment cette enzyme uniformément au sein de leur noyau. Par conséquent, ceux-ci peuvent être ciblés dans le cadre d'une micro-irradiation par faisceau d'ions. Il a été montré que OGG1 est recrutée au niveau des lésions ADN indirectes induites par des UVA quelques secondes après irradiation (Campalans *et al* 2007). Au cours de ces travaux, nous avons appliqué la méthode mise au point grâce à l'étude de XRCC1-GFP pour mesurer la cinétique de relocalisation d'OGG1-GFP après micro-irradiation ciblée.

2.2. Protocole d'irradiation et de vidéomicroscopie

Le protocole d'irradiation des noyaux de cellules HeLa exprimant la protéine XRCC1-GFP ou OGG1-GFP se déroule en plusieurs étapes : la visualisation, la sélection des cellules à irradier, l'irradiation des cibles et la vidéomicroscopie.

2.2.1. Visualisation, sélection et ciblage

Le puits de culture contenant les cellules est placé verticalement entre la fenêtre d'extraction et les objectifs du microscope. Le contenu du puits est visualisé en fluorescence avec le microscope et rapidement exploré afin de déterminer des zones d'intérêt. Le ciblage des noyaux cellulaires d'intérêt et l'acquisition des images ont été effectués avec un objectif 63x à longue distance de travail (LD Plan-Neofluar 63x/0.75, Résolution optique d'environ 400 nm, Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

Les noyaux cellulaires visibles en fluorescence et sélectionnés sont donc choisis comme cible (cf. Figure 21), et leur position est enregistrée par le programme MIA afin de venir placer le faisceau en ce point lors de l'irradiation.

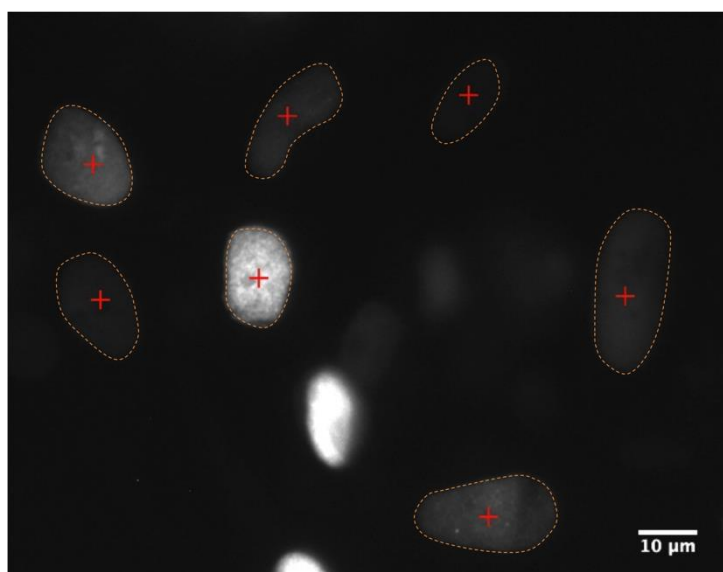


Figure 21 : Sélection de noyaux pour l'irradiation – exemple de noyaux exprimant XRCC1-GFP. Les noyaux sélectionnés sont marqués d'une croix rouge et leur position est enregistrée pour y positionner le faisceau d'ions.

2.2.2. Irradiation et vidéomicroscopie

Les noyaux ciblés ont été irradiés avec des protons ou des particules α de 3 MeV. Le nombre de particules délivrées dans les noyaux cellulaires a été contrôlé en ajustant le temps d'ouverture du faisceau. L'incertitude associée au nombre moyen N de particules délivrées est \sqrt{N} , toute autre source d'incertitude (sur l'intensité du faisceau, le temps d'irradiation, ...) étant négligée.

Dans le cas de la caractérisation de la précision de tir du système, les noyaux ont été irradiés selon un motif en croix de 5 points et de 10 μm de large. Dans les études de cinétique de recrutement de XRCC1-GFP et OGG1-GFP, les noyaux ont été irradiés en un point unique.

L'irradiation est réalisée en parallèle de la vidéomicroscopie. L'irradiation a lieu 10 s après le début de l'enregistrement. Afin de limiter les effets délétères d'une exposition trop importante de la lumière utilisée pour la fluorescence (photoblanchiment, ...), un compromis doit être trouvé entre qualité des images, quantité d'informations, et intensité de la lumière. Pour cela, nous avons choisi un intervalle de 2 secondes entre chaque image, avec un temps d'exposition des images entre 150 et 300 ms.

La durée d'acquisition pour les noyaux exprimant la protéine XRCC1-GFP a été de 3 min, et pour les noyaux exprimant la protéine OGG1-GFP, de 10 à 30 minutes.

3. Micro-irradiation d'un organisme multicellulaire : *Caenorhabditis elegans*

Le passage de modèles cellulaires *in vitro* à des modèles multicellulaires *in vivo* représente aujourd'hui un des enjeux de l'irradiation par microfaisceau. Dans ces travaux, nous avons mis au point les protocoles nous permettant de procéder à la micro-irradiation ciblée d'embryons précoces du nématode *C. elegans*. Par ailleurs, nous avons utilisé la vidéomicroscopie en ligne afin d'irradier les embryons à un stade particulier et de suivre leur évolution pendant plusieurs dizaines de minutes.

3.1. Les lignées de *C. elegans* utilisées

Différentes lignées transgéniques de nématodes parfaitement caractérisées sont disponibles auprès du *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, Université du Minnesota, États-Unis). Certaines de ces lignées ont été conçues afin d'exprimer une ou plusieurs protéines d'intérêt couplées à un ou plusieurs fluorochromes. Dans nos travaux, nous avons choisi d'irradier le noyau d'une des deux cellules d'embryons précoces de *C. elegans*. Les lignées choisies expriment donc des protéines fluorescentes présentes dans le noyau cellulaire, liées à la chromatine, à la reconnaissance de dommages, ou au cycle cellulaire. Quatre lignées ont été utilisées dans ces travaux :

- La lignée MG152, qui exprime l'histone H2B fusionnée à la GFP. L'histone H2B entre dans la formation des nucléosomes nécessaires à la condensation chromatinienne au cours des différentes phases de division cellulaire. Cette lignée a été utilisée dans un premier temps pour visualiser les noyaux cellulaires embryonnaires afin de les cibler et de les irradier de manière sélective. Dans un second temps, la lignée a été utilisée pour étudier l'impact des irradiations sur la dynamique chromatinienne au cours de la division cellulaire embryonnaire.

- La lignée WS1433, qui exprime la protéine HUS-1 fusionnée à la GFP. La protéine HUS-1 entre dans la formation du complexe 9-1-1, en s'associant avec les RAD-9 et RAD-1, impliqué dans la réparation des dommages ADN et l'arrêt du cycle cellulaire. HUS-1 est une protéine nucléaire qui est exprimée au sein des cellules germinales et des oocytes. Il a également été montré que cette protéine est accumulée au niveau des sites ADN endommagés. Ainsi, au cours de ces travaux, la lignée WS1433 a été utilisée afin de visualiser la formation des dommages ADN au sein des noyaux embryonnaires irradiés. (Hofmann *et al* 2002)
- La lignée GZ264, qui exprime la protéine PCN-1 (*Proliferating Cell Nuclear Antigen 1*) fusionnée à la GFP. PCN-1 est impliquée dans la réplication de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire. La protéine de fusion GFP::PCN-1 s'exprime au sein des cellules germinales et des oocytes. De plus, en phase S, la protéine est exclusivement nucléaire alors qu'elle est localisée de manière plus diffuse au sein du cytoplasme en cours de mitose (Brauchle *et al* 2003). Il a été montré que la protéine GFP::PCN-1 était un marqueur du cycle cellulaire et surtout de la phase S (Kisieleska *et al* 2005). Au cours de nos travaux, la lignée GZ264 a donc été utilisée afin d'irradier sélectivement des cellules embryonnaires en phase S.
- La lignée SA250, qui exprime l'histone H2B et la tubuline- γ associées à la protéine fluorescente rouge mCherry ainsi que la tubuline- β couplée à la GFP. En observant des embryons de la lignée SA250 en microscopie à fluorescence, les chromosomes sont visibles en rouge (mCherry::H2B), les microtubules en vert (GFP:: β -tubuline) et les centrosomes en jaune (co-localisation entre les protéines GFP:: β -tubuline et mCherry:: γ -tubuline). L'utilisation de cette lignée permet donc d'observer la condensation chromatinienne associée à la formation des fuseaux mitotiques au cours des divisions cellulaires embryonnaires (Toya *et al* 2010). Par ailleurs, cette lignée a été utilisée pour mettre au point l'acquisition en temps réel et en multi-couleurs.

La lignée SA250 nous a été donnée par Asako Sugimoto (*The Sugimoto Lab.*, Université de Tohoku, Japon), tandis que les autres lignées ont été obtenues auprès du CGC.

3.2. Préparation des puits de culture

Les nématodes sont cultivés selon les protocoles définis par S. Brenner et T. Stiernagle (Brenner 1974, Stiernagle 2006).

Nos travaux se sont concentrés sur l'irradiation d'embryons précoces. Ces embryons présentent la particularité d'être formés de cellules embryonnaires bien distinctes et facilement identifiables en microscopie. Les embryons au stade 2-cellules sont composés d'une cellule AB et

d'une cellule P1 orientées selon un axe antéro-postérieur. La Figure 22 résume les étapes de préparation du puits de culture pour l'irradiation.

Des embryons extraits et sélectionnés au stade précoce sont déposés entre deux feuilles de polypropylène de 4 μm d'épaisseur en présence d'une fine couche de milieu de culture pour empêcher leur déshydratation. L'ensemble de ces étapes est fait à température ambiante ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) et doit être réalisé en moins de 20 min, temps qu'il faut en moyenne à un embryon 2-cellules pour atteindre le stade 4-cellules.

Cette configuration de puits de culture présente également un certain nombre d'avantages d'un point de vue physique. La faible quantité de milieu de culture nécessaire réduit de manière significative le risque de distorsion du chemin optique de la lumière lorsqu'elle traverse l'échantillon. Ceci, couplé à l'utilisation du puits d'étalonnage « à sec » (cf. Chapitre A-2.3.4), permet d'avoir les meilleures conditions possibles pour une bonne précision de tir. De plus, les protons de 3 MeV ont un parcours suffisant pour traverser le puits de culture et pour ainsi être détectés en aval.

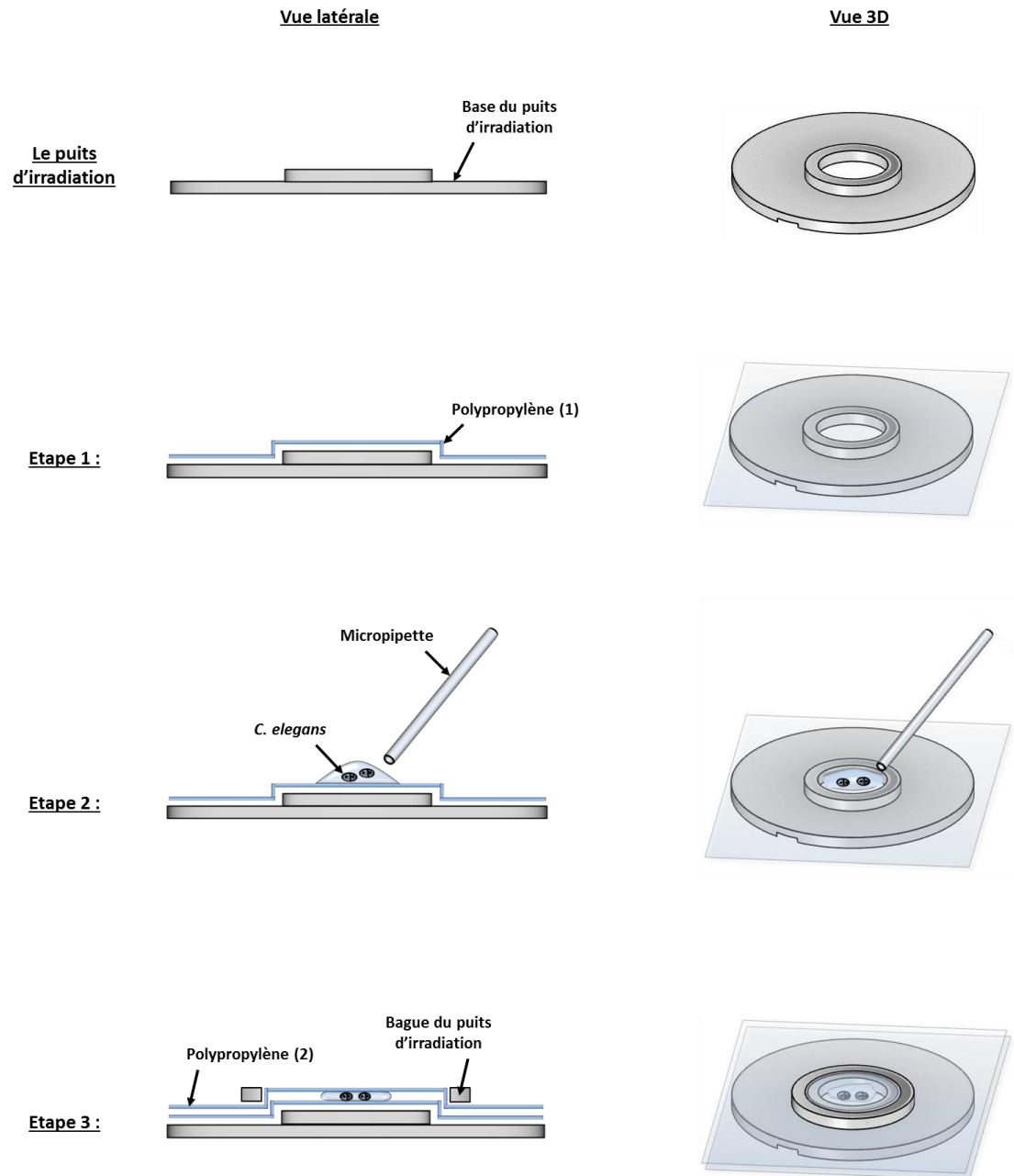


Figure 22 : Montage du puits d'irradiation pour l'irradiation des embryons de *C. elegans*. Les embryons au stade 2-cellules sont sélectionnés à partir d'une population d'embryons extraits par traitement chimique. Une feuille de polypropylène de 4 μm d'épaisseur est placée sur la base du puits d'irradiation. Les embryons précoces sont déposés sur le polypropylène avec un capillaire en verre. Une seconde feuille de polypropylène est ensuite placée sur les embryons sans compromettre leur intégrité. Les embryons sont donc maintenus dans du milieu de culture, entre les deux feuilles de polypropylène. Celles-ci sont tendues grâce à la bague qui est finalement placée sur la base du puits d'irradiation.

3.3. Protocole d'irradiation et de vidéomicroscopie

Le protocole utilisé pour l'irradiation des embryons de *C. elegans* se décompose en plusieurs étapes : la visualisation, la sélection des embryons à irradier, l'irradiation et la vidéomicroscopie.

3.3.1. Visualisation

Le puits de culture contenant les embryons sélectionnés est placé verticalement entre la fenêtre d'extraction et les objectifs du microscope. Le contenu du puits est visualisé en fluorescence avec le microscope et le puits est rapidement exploré afin de déterminer des zones d'intérêt. Le ciblage des embryons et l'acquisition des images ont été effectués avec le même objectif que dans le chapitre B-2.2.1.

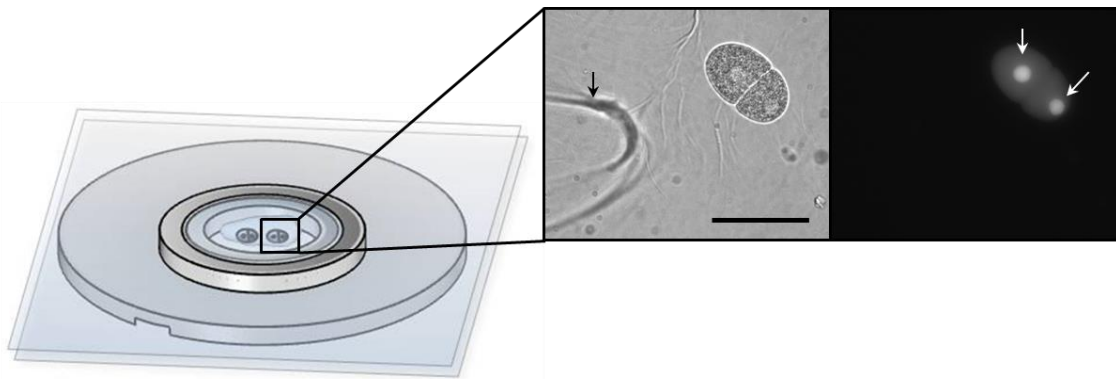


Figure 23 : Visualisation des embryons au sein du puits d'irradiation. Les embryons sont maintenus dans du M9 entre deux feuilles de polypropylène de 4 µm d'épaisseur tout au long de la procédure d'irradiation. La transparence des embryons et l'utilisation de lignées embryonnaires transgéniques permettent de discerner certains compartiments cellulaires embryonnaires. Ici, en observant un embryon GZ264 avec le système de microscopie, il est possible de visualiser en lumière transmise les embryons présents dans le puits d'irradiation (la flèche noire montre un motif présent sur une des feuilles de polypropylène) et de distinguer les noyaux cellulaires en fluorescence (flèches blanches). Échelle : 50 µm

3.3.2. Sélection des embryons et des cibles à irradier

Les embryons précoces au stade 2-cellules sont constitués des cellules AB et P1. La cellule AB est légèrement plus grande que la cellule P1 et se situe à l'extrémité antérieure de l'embryon. Cette différence de taille entre les deux cellules permet de les différencier, mais également d'orienter les embryons selon leur axe antéropostérieur. Nous avons ciblé le noyau de la cellule AB de chaque embryon au stade 2-cellules.

3.3.3. Irradiation et vidéomicroscopie

Nous avons choisi d'irradier les embryons avec des protons de 3 MeV. Le parcours de ces particules dans l'eau (150 µm) est en effet suffisant pour procéder à l'irradiation d'embryons qui ont une épaisseur d'environ 30 µm. Par ailleurs, grâce à la configuration du puits de culture, les protons de 3 MeV peuvent être détectés en aval de l'échantillon via la photodiode PIN (cf. chapitre A-3.1), ce qui permet un contrôle absolu du nombre de particules délivrées.

Par rapport à l'irradiation de cellules, où l'échantillon est immobile, et à un stade du cycle cellulaire défini et stable à l'échelle de temps considérée, les embryons précoces de *C. elegans* ont un cycle de division beaucoup plus rapide. Un embryon au stade 2-cellules passe ainsi au stade 4-cellules en moins de 20 minutes. Le défi technique est donc d'irradier un échantillon en division,

à un stade bien défini du cycle cellulaire. Pour cela, l'utilisation de la vidéomicroscopie s'avère indispensable. En effet, elle permet de visualiser en temps réel l'évolution des embryons dans leur cycle de division. Ainsi, il est possible de déterminer précisément le moment où l'irradiation doit avoir lieu, mais aussi la position du noyau à irradier. Dans nos travaux, les noyaux des cellules AB ont été irradiés au début de la mitose, à un stade avancé de condensation de la chromatine. Grâce à la mise en place automatique de la photodiode en face du faisceau lors de l'irradiation, il n'est pas nécessaire d'interrompre la vidéomicroscopie lors de l'irradiation.

Une exposition prolongée à la lumière utilisée pour la visualisation en fluorescence induit des lésions photo-induites pouvant compromettre la survie des embryons et un phénomène de photoblanchiment dégradant la qualité des images. Il est donc nécessaire de définir les conditions d'illumination les moins délétères possibles, tout en gardant un nombre et une qualité d'image acceptables. Afin de garder un bon compromis entre la durée de la vidéo et le nombre d'échantillons irradiés, nous avons choisi de réaliser des acquisitions d'une durée maximum d'une heure. Ainsi, l'embryon passe du stade 2-cellules au stade 8-cellules.

4. Analyse des données

4.1. Mesure de l'évolution de la fluorescence à l'échelle cellulaire

Les protéines XRCC1 et OGG1 sont impliquées dans les voies de réparation de l'ADN et sont recrutées au niveau des lésions ADN radio-induites quelques minutes après exposition aux rayonnements (Mortusewicz and Leonhardt 2007, Campalans *et al* 2007). La vidéomicroscopie permet alors de suivre en temps réel ce recrutement.

Les données de vidéomicroscopie obtenues sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Les images successives correspondant à une vidéo sont regroupées sous la forme d'un empilement d'images, en un seul fichier. Le principe de l'analyse des images après irradiation est résumé sur la Figure 24. Une fois ce regroupement effectué, chaque noyau cellulaire irradié est sélectionné et placé dans une séquence individuelle. Quelques noyaux non-irradiés sont également choisis comme noyaux-contrôles.

Dans chaque noyau sélectionné, trois zones d'intérêt (ou ROI, pour *Region Of Interest*) sont créées. Ces zones sont créées en appliquant un seuil sur l'intensité des pixels : seuls les pixels d'intensité supérieure à un certain seuil seront inclus dans la ROI :

- une ROI correspondant à la totalité du noyau, notée *tot* ;
- une ROI correspondant à la zone irradiée, notée *i* (cette région a été définie et sélectionnée au moment où l'intensité de fluorescence au niveau du site d'accumulation est maximale) ;

- une ROI correspondant à la zone non-irradiée du noyau, notée ni , déterminée en soustrayant la zone i de la zone tot : $ni = tot - i$.

Une fois les régions d'intérêt créées, plusieurs données sont mesurées directement à l'aide d'ImageJ, notamment l'aire de chaque zone (en μm^2), ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence dans chaque zone et dans chaque image de la séquence.

Les données d'intensité moyenne sont utilisées pour mesurer l'évolution de la fluorescence dans chaque zone après irradiation en fonction du temps. Afin de corriger des effets de photoblanchiment, l'intensité de fluorescence de la zone considérée est corrigée de celle du noyau total, qui reste constante tout au long de la séquence. De plus, afin de pouvoir comparer les différents noyaux sélectionnés entre eux, chaque valeur d'intensité est ramenée à une intensité relative par rapport à l'intensité moyenne initiale. On obtient ainsi $I_{j,i}^{rel}$, intensité relative de fluorescence dans la zone irradiée de la $j^{ième}$ image de la séquence et $I_{j,ni}^{rel}$, intensité relative de fluorescence dans la zone non-irradiée de la $j^{ième}$ image de la séquence :

$$I_{j,i \text{ ou } ni}^{rel} = \frac{I_{j,i \text{ ou } ni}}{I_{j,tot}} \bigg/ \frac{I_{1,i \text{ ou } ni}}{I_{1,tot}}$$

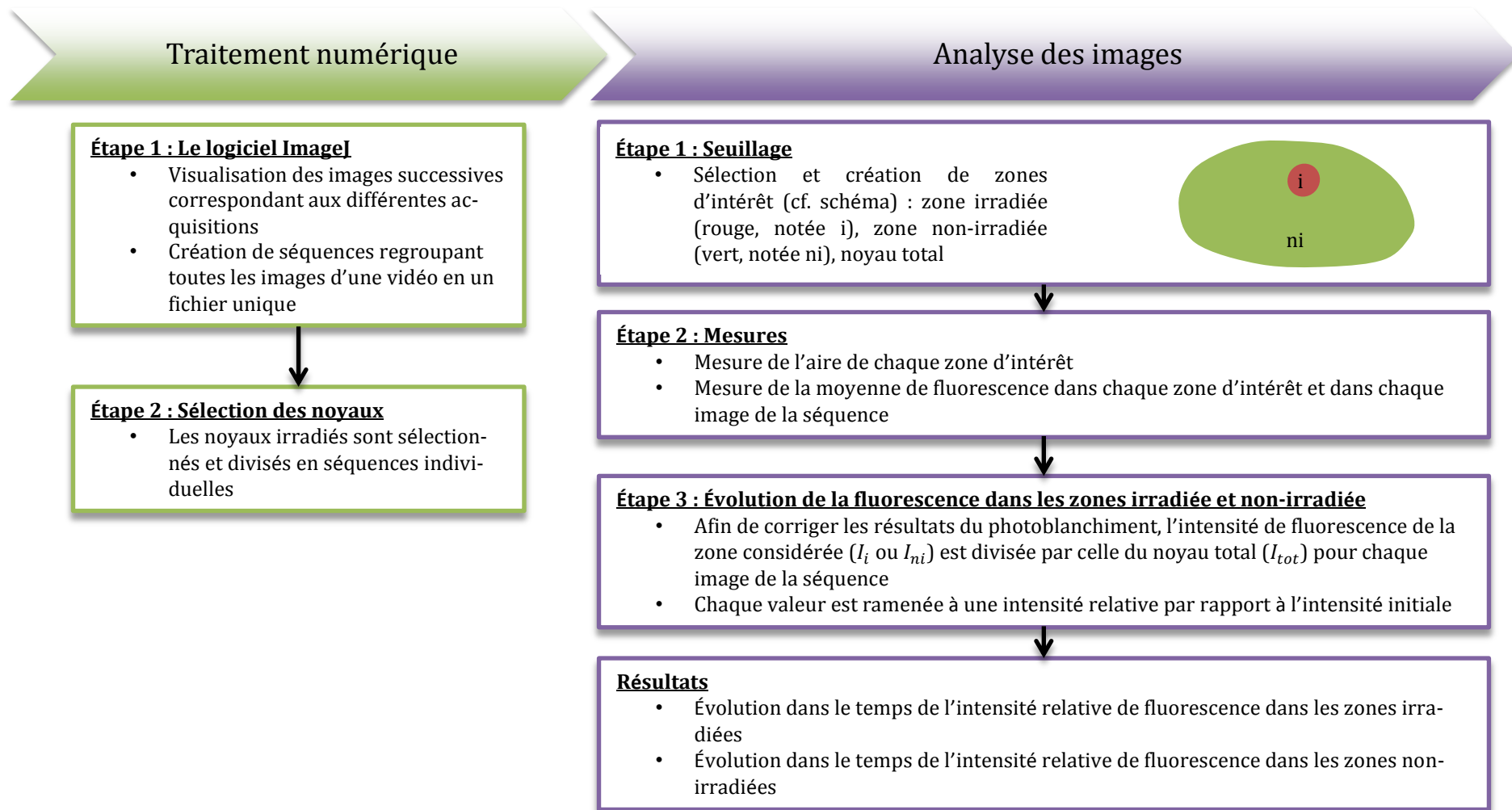


Figure 24 : Résumé de l'analyse des images obtenues par vidéomicroscopie post-irradiation sur des noyaux de cellules HeLa exprimant la protéine XRCC1-GFP ou OGG1-GFP. Les mesures sur les images sont réalisées avec le logiciel ImageJ.

4.2. Mesure du mouvement de noyaux cellulaires d'un embryon précoce de *C. elegans*

Comme dans le cas d'échantillons cellulaires, les données de vidéomicroscopie obtenues sont regroupées et analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Le principe de l'analyse des images après irradiation est résumé sur la Figure 25. Chaque embryon précoce, qu'il ait été irradié ou non, est sélectionné et placé dans une séquence individuelle. Afin de pouvoir comparer plus facilement les images entre-elles, les embryons sont tous orientés selon leur axe antéro-postérieur, avec la cellule AB à gauche de l'image. Une orientation selon l'axe dorso-ventral est également effectuée. Malgré l'optimisation des conditions d'imagerie de fluorescence, le photoblanchiment de l'image peut être relativement important. Une correction est donc réalisée avec le plugin « *Bleach Correction* » (http://cmci.embl.de/downloads/bleach_corrector), qui applique un ajustement exponentiel sur l'image afin de corriger la baisse de fluorescence. La luminosité et le contraste sont également ajustés afin d'améliorer la qualité de l'image.

Afin de détecter les objets d'intérêt que sont les noyaux des cellules embryonnaires et l'embryon total, différents seuils d'intensité de pixels sont appliqués manuellement sur les séquences. Cette étape permet d'obtenir les positions x et y des centroïdes des objets détectés au cours du temps et ainsi de mesurer le temps d'entrée en division des cellules ainsi que la distance entre les cellules au cours du temps. Cela permet de détecter toute anomalie dans cette division.

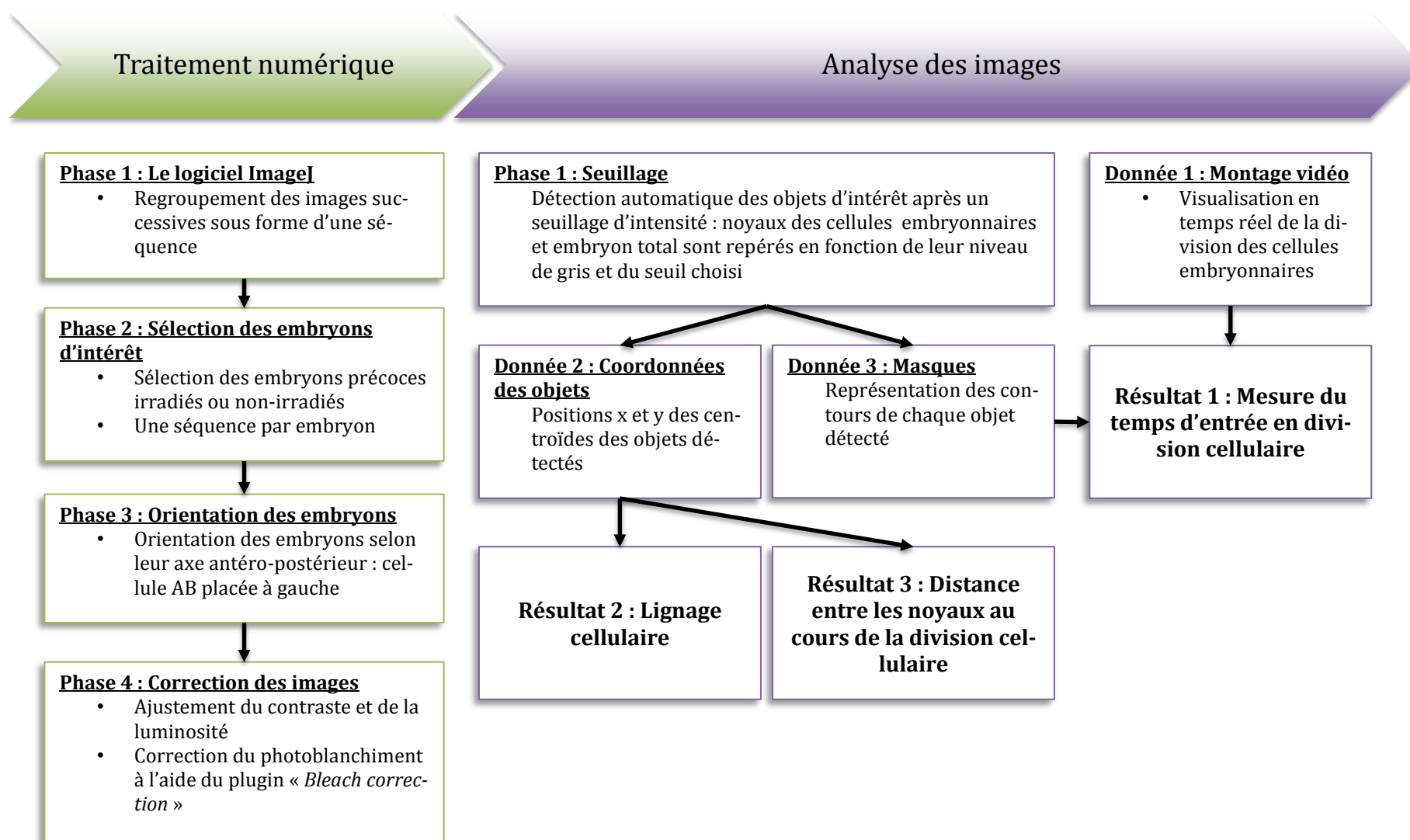


Figure 25 : Résumé de l'analyse des images obtenues par vidéomicroscopie post-irradiation sur des embryons précoces de *C. elegans*. Le traitement d'images ainsi que les différentes mesures sont effectuées grâce au logiciel ImageJ.

C – MICRODOSIMÉTRIE DE L'IRRADIATION PAR FAISCEAU D'IONS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE ET MULTICELLULAIRE

1. Microdosimétrie sur un modèle cellulaire réaliste

La méthode décrite dans ce chapitre repose sur la modélisation Monte-Carlo, avec l'outil de simulation Geant4 (Agostinelli *et al* 2003, Allison *et al* 2006), de l'irradiation par des particules chargées d'un modèle cellulaire réaliste tant au niveau de sa géométrie que de sa composition chimique. Ce travail se base sur l'expérience accumulée dans le groupe IPCV pour la modélisation de l'irradiation d'une cellule unique (Incerti *et al* 2009), et d'une monocouche cellulaire (Barberet *et al* 2012). Nous décrirons ici les méthodes employées pour caractériser la géométrie et la composition chimique du modèle cellulaire réaliste. Nous détaillerons enfin le dispositif d'irradiations modélisé.

1.1. Le modèle cellulaire

L'originalité de cette méthode est qu'elle permet d'effectuer des calculs de microdosimétrie sur une géométrie cellulaire tridimensionnelle mesurée par microscopie confocale. De plus, la micro-analyse par faisceau d'ion réalisée couramment au laboratoire nous donne accès à la composition chimique des cellules. Nous obtenons alors un modèle cellulaire réaliste, appelé « fantôme cellulaire », par analogie avec les fantômes humains utilisés dans la communauté de la physique médicale et de la dosimétrie (étalonnage de dosimètres sur fantômes).

1.1.1. Géométrie

Lors de ces travaux, nous nous sommes intéressés aux dommages ADN et avons donc choisi de modéliser le noyau cellulaire. Ce modèle permet de calculer avec une grande précision la topologie du dépôt d'énergie dans le cadre d'une micro-irradiation ciblée. Ceci nous renseigne sur la taille de la zone irradiée au sein d'un noyau et nous permet de calculer, en plus de la dose globale déposée dans la totalité du noyau, la dose locale déposée spécifiquement dans la zone irradiée.

Des images tridimensionnelles de cellules HaCaT, issues du travail de thèse de Thomas Pouthier (Pouthier 2006), modifiées génétiquement pour exprimer l'histone H2B fusionnée à la GFP, ont été réalisées au *Bordeaux Imaging Center* (BIC) à l'aide d'un microscope confocal Leica DMRE TCS SP2 AOBS. La taille des voxels dans ce cas est de 80 nm en (x ; y) et de 160 nm en z.

Les images acquises par microscopie confocale sont ensuite transférées dans le logiciel ImageJ. Les données du fantôme cellulaire sont importées dans Geant4 à l'aide d'un fichier contenant le nombre total de voxels, leur taille selon les 3 dimensions de l'espace, un décalage spatial afin de centrer le fantôme par rapport à la source d'ions de la simulation, et la liste des positions, compositions et intensités de chaque voxel.

L'implémentation des fantômes cellulaires dans Geant4 est décrite par Incerti *et al* (Incerti *et al* 2009). L'approche choisie ici est l'approche « purement » paramétrée. Dans cette approche, le fantôme cellulaire est constitué de multiples copies identiques d'un voxel parallélépipédique. Le fantôme est implémenté en utilisant la classe *G4PVParametrised* de Geant4. Chaque voxel individuel contient l'information sur sa position absolue au sein du fantôme cellulaire, ainsi que sur sa composition chimique et sa densité locales. Le fantôme cellulaire utilisé dans le cadre de la modélisation d'une cellule unique est représenté sur la Figure 26.

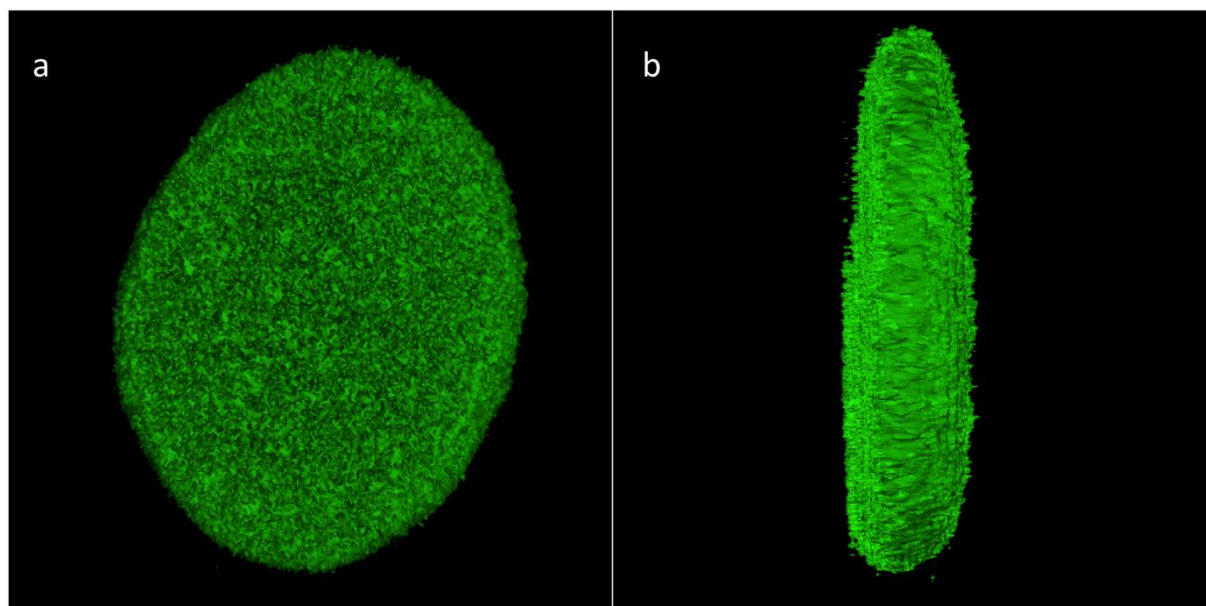


Figure 26 : Vue en isosurface du fantôme cellulaire utilisé dans les simulations Geant4 dans le cadre de la modélisation d'un noyau cellulaire. (a) Vue de face. Le noyau cellulaire apparaît en vert sur un fond noir. Diamètre moyen du noyau : 13 μm . Épaisseur moyenne du noyau : 3 μm (b) Vue de côté du même noyau cellulaire. Les images sont produites avec le plugin *3D Viewer* d'ImageJ.

1.1.2. Composition chimique

L'imagerie quantitative de la distribution des éléments chimiques des cellules a été réalisée sur la ligne de faisceau haute-résolution de la plate-forme AIFIRA en utilisant trois techniques complémentaires d'analyse par faisceau d'ions : PIXE, RBS et STIM (Simon *et al* 2011, Barberet *et al* 2011). Les cellules, lyophilisées, ont été analysées avec un microfaisceau de protons de 1,5 MeV, focalisé pour atteindre une taille d'environ 1 μm pour la PIXE et la RBS et d'environ 300 nm pour la STIM. La Figure 27 représente un exemple de distributions en densité, éléments organiques, et éléments traces au sein de cellules HaCaT, cryofixées et lyophilisées, obtenues par analyse par faisceau d'ions.

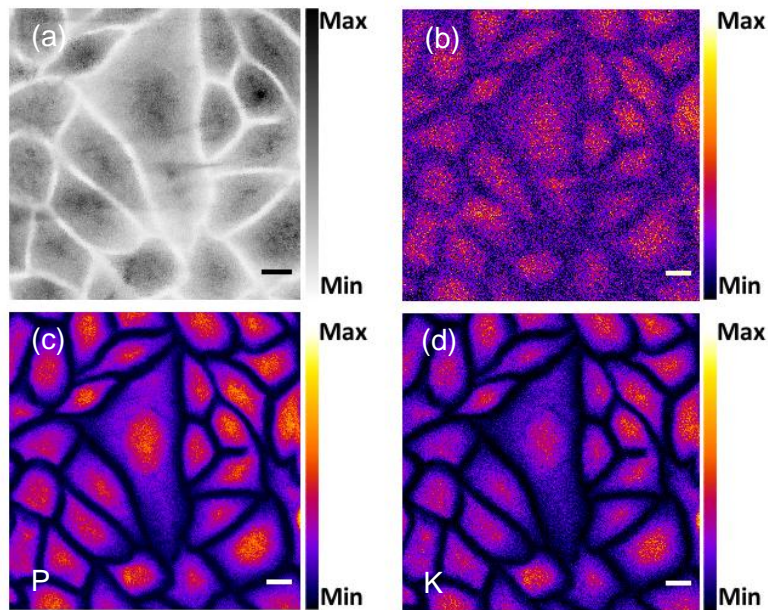


Figure 27 : Analyse par faisceau d'ions de cellules HaCaT : (a) cartographie STIM montrant la densité de l'échantillon, (b) cartographie RBS montrant la distribution en éléments organiques (C, N, O), (c) cartographie du phosphore obtenue par analyse PIXE et (d) cartographie du potassium obtenue par analyse PIXE. La cartographie RBS montre le nombre de particules rétrodiffusées par pixel et les cartographies PIXE montrent le nombre de photons X par pixel pour l'élément considéré. Barre d'échelle : 10 µm. (Barberet *et al* 2012)

En considérant qu'un noyau cellulaire contient 70% d'eau et 30% de matière sèche, il est alors possible de calculer les concentrations en éléments chimiques dans des échantillons hydratés. La composition chimique utilisée dans nos simulations est donnée dans le Tableau 2. La masse volumique d'un noyau cellulaire n'étant pas facilement mesurable et pouvant varier entre différentes lignées cellulaires, une masse volumique de 1 g.cm^{-3} a été choisie en tant que valeur de référence.

Tableau 2 : Pourcentage en fraction de masse des principaux éléments chimiques présents dans un noyau de cellule HaCaT hydraté. Les éléments présentant une concentration inférieure à 0,1% n'ont pas été pris en compte étant donnée leur contribution négligeable. (Barberet *et al* 2012)

Élément	Fraction de masse (%)
Hydrogène	11,2
Carbone	19,2
Azote	0,7
Oxygène	67,3
Phosphore	0,6
Potassium	0,6
Sodium	<0,1
Magnésium	<0,1
Silicium	<0,1
Soufre	<0,1
Chlore	<0,1
Calcium	<0,1

1.2. Processus physiques

Ce travail a été réalisé sur la version 9.6.p01 de Geant4 en utilisant les classes de physique standard. Dans la gamme d'énergie du MeV, les processus physiques affectant les particules α et les protons sont la diffusion multiple et l'ionisation. La diffusion multiple a été simulée en utilisant la classe *G4hMultipleScattering* et l'ionisation en utilisant la classe *G4ionIonisation*. Les électrons secondaires dus à l'ionisation sont suivis à l'aide de l'ensemble de modèles de Livermore, pour l'ionisation et le *Bremsstrahlung*, décrits respectivement par les classes *G4LivermoreIonisationModel* et *G4LivermoreBremsstrahlungModel*, tout en prenant également en compte leur diffusion multiple avec la classe *G4eMultipleScattering*. La documentation de Geant4 (<http://geant4.org/>) donne davantage de détails sur ces classes.

Un seuil de production de particules secondaires doit être choisi. Ce seuil, défini comme une distance, et également appelé seuil de coupure, est converti en énergie pour chaque matériau considéré. En dessous de cette énergie, aucune particule secondaire ne sera produite. Dans notre cas, le seuil de coupure est de 1 μm . Par ailleurs, afin d'assurer un suivi fiable des particules dans les différents matériaux, le pas, c'est à dire la distance entre deux interactions d'une particule avec le milieu, doit être adapté. Dans nos calculs, un pas maximal de 1 mm a été choisi.

1.3. Modélisation du dispositif d'irradiation

Pour des raisons de temps de calcul, le microfaisceau n'a pas été modélisé en totalité. Seuls les points-clés, c'est à dire ayant une influence significative sur l'énergie et la taille du faisceau à l'entrée dans les cellules, ont été implémentés dans la simulation. La source du faisceau primaire est située sous vide, juste avant la fenêtre d'extraction. Elle est représentée par un faisceau de protons ou de particules α dont le diamètre suit une distribution normale de 500 nm de largeur

à mi-hauteur et dont l'énergie suit également une distribution normale centrée sur 3 MeV et de largeur à mi-hauteur correspondant à la dispersion en énergie du faisceau (51 eV).

Avant d'atteindre les cellules, le faisceau est extrait à l'air. Cette extraction ayant une influence notable sur l'énergie et la taille du faisceau à la position de l'échantillon, tous les matériaux traversés doivent être pris en compte dans la simulation. Dans la configuration sans détecteur de particules, le faisceau traverse les matériaux suivants : une fenêtre de Si_3N_4 de 150 nm d'épaisseur, une couche d'air résiduelle estimée à 200 μm d'épaisseur, et une feuille de polypropylène de 4 μm d'épaisseur servant de support aux cellules. Le puits de culture expérimental est conçu pour maintenir les cellules dans leur milieu de culture. Pour les simulations Geant4, le fantôme cellulaire est immergé dans de l'eau. Le dispositif est représenté sur la Figure 28 (Barberet *et al* 2012).

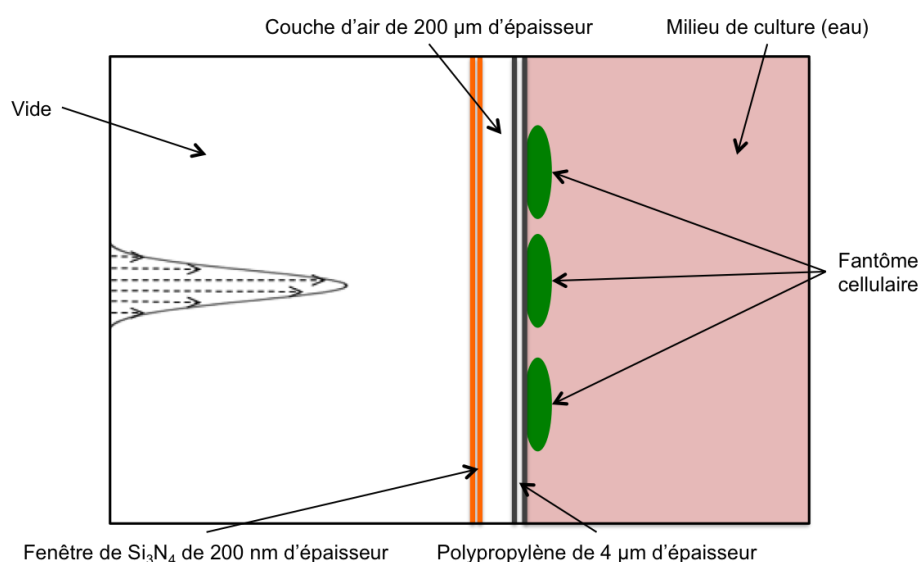


Figure 28 : Représentation schématique du dispositif d'irradiation par microfaisceau d'ions implémenté dans Geant4. Le microfaisceau lui-même est modélisé par un faisceau dont le diamètre suit une loi normale de 500 nm de largeur à mi-hauteur.

1.4. Données obtenues

Différentes données sont obtenues à l'issue de la modélisation :

- la position des particules issues du faisceau d'ions à leur entrée dans le polypropylène ;
- l'énergie déposée dans chaque voxel ;
- l'énergie déposée dans la totalité du noyau.

Il est ainsi possible, à partir de ces données de calculer différentes grandeurs, comme la dose globale déposée dans chaque noyau. Par ailleurs, à partir de la distribution spatiale du dépôt d'énergie, il est possible de remonter à la taille du faisceau et à celle de la zone irradiée. Ceci permet aussi de calculer la dose locale déposée, c'est à dire la dose déposée dans un cylindre englobant la zone irradiée (et non plus dans la totalité du noyau).

2. Dosimétrie de l'irradiation d'un embryon précoce de *Caenorhabditis elegans*

Comme lors de l'irradiation à l'échelle cellulaire, l'irradiation à l'échelle multicellulaire doit être caractérisée précisément afin de comprendre les phénomènes biologiques observés. À l'aide de la modélisation Monte-Carlo, avec l'outil de simulation Geant4, nous avons modélisé l'irradiation par microfaisceau d'ions d'un embryon précoce de *C. elegans*.

2.1. Modélisation de l'embryon de *C. elegans*

Contrairement aux fantômes cellulaires du chapitre C-1, nous ne disposons pas de données de microscopie confocale pour réaliser nos calculs sur un modèle réaliste d'embryon précoce de *C. elegans*. L'embryon est donc modélisé à l'aide de formes mathématiques élémentaires.

L'enveloppe extérieure de l'embryon est représentée par un ellipsoïde de 50 μm de grand axe et de 30 μm de petit axe. À l'intérieur de l'ellipsoïde, deux sphères de 10 μm de diamètre représentent les deux noyaux cellulaires. Les tailles de ces différentes structures ont été obtenues à partir de la littérature.

Aucune donnée d'analyse par faisceau d'ions n'est disponible sur des embryons précoces de *C. elegans*. Par conséquent, la composition chimique des embryons n'est pas connue avec précision. Nous avons choisi l'eau liquide en tant que matériau composant l'embryon. En regard des données obtenues par analyse par faisceau d'ions pour des échantillons cellulaires, regroupées dans le Tableau 2, et qui montrent que la composition chimique des cellules hydratées n'est pas très éloignée de celle de l'eau, cette approximation est tout à fait valable (Barberet *et al* 2012).

2.2. Processus physiques

Les processus physiques mis en jeu dans le cas d'un échantillon multicellulaire sont les mêmes que dans le cas d'une cellule unique. Les modèles utilisés pour la simulation sont donc les mêmes que ceux décrits dans le chapitre C-1.2.

2.3. Modélisation du dispositif d'irradiation

Les embryons de *C. elegans* ont été irradiés par microfaisceau de protons. Le dispositif d'irradiation modélisé est donc le même que dans le chapitre C-1.3 avec un faisceau de protons de 3 MeV. La seule différence réside dans l'échantillon lui-même, où la couche résiduelle de milieu présente entre les embryons et les feuilles de polypropylène est tellement fine que nous l'avons négligée.

2.4. Données obtenues

Les données obtenues à l'issue de la modélisation sont :

- la position des protons lors de leur entrée dans l'embryon ;
- l'énergie déposée dans le noyau irradié ;
- l'énergie déposée dans le noyau non-irradié ;
- l'énergie déposée dans le reste de l'embryon.

À partir de ces données, il est possible de calculer la dose déposée dans le noyau irradié et dans le noyau non-irradié, ainsi que celle déposée dans la totalité de l'embryon. Il est également possible de visualiser la distribution spatiale des particules à l'entrée dans l'embryon, ce qui nous permet de déterminer la taille du faisceau.

RÉSULTATS

D – PERFORMANCES DE LA LIGNE DE MICRO-IRRADIATION

Avant de pouvoir procéder en routine à des irradiations d'échantillons biologiques vivants il est nécessaire de caractériser les performances du système développé : taille du faisceau, précision du positionnement et du ciblage, efficacité des systèmes de détection.

Ce chapitre a pour but de présenter les caractéristiques de la nouvelle version de la ligne de micro-irradiation, ainsi que les mesures d'efficacité de détection des deux systèmes de détection développés dans le cadre de cette thèse.

1. Caractérisation du dispositif

1.1. Positionnements électrostatique et mécanique

Lors de l'irradiation d'un champ de microscope, que ce soit pour une irradiation en réseau ou ciblée, le faisceau d'ions est positionné à l'aide des plaques de balayage électrostatique. Les mouvements plus grands d'un champ à un autre sont assurés par les platines motorisées chargées de déplacer le porte-échantillon.

Le premier travail de caractérisation a consisté à vérifier l'exactitude du positionnement électrostatique du faisceau, ainsi que celle du positionnement mécanique du porte-échantillon lors de l'irradiation de plusieurs champs adjacents. Pour cela, nous avons procédé à l'irradiation de détecteurs solides de traces de type CR39, fréquemment utilisés pour caractériser les microfaisceaux d'ions (Peng *et al* 2001, Heiss *et al* 2006).

L'irradiation selon un motif de réseau régulier permet de tester le balayage électrostatique du faisceau : les traces des ions sur CR39 après attaque chimique doivent alors suivre le même motif que celui demandé par l'utilisateur, avec une bonne régularité. Par ailleurs, l'association de ce mode d'irradiation en réseau avec l'irradiation automatique de plusieurs champs adjacents (mode « mosaïque ») permet de vérifier le déplacement mécanique du porte-échantillon d'un champ à un autre.

Le CR39 présenté sur la Figure 29 a été irradié suivant un réseau de lignes espacées de 15 μm constituées de points espacés de 5 μm , avec 15 ± 4 particules α sur chaque point. Plusieurs champs adjacents ont ainsi été irradiés, en mode automatique.

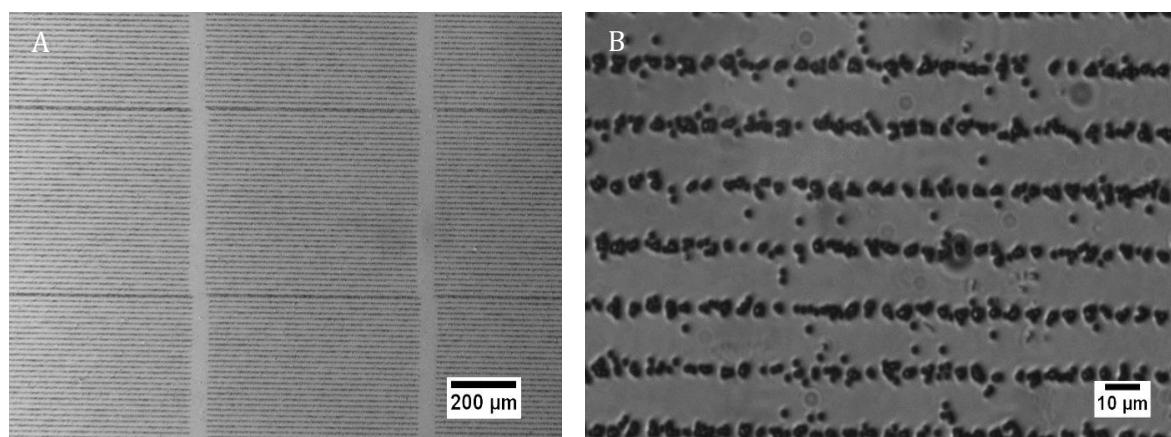


Figure 29 : Irradiation en réseau de détecteur de traces en mode mosaïque. (A) Vue globale de la mosaïque. Différents champs adjacents ont été irradiés suivant un réseau de 130×35 points, formant ainsi des lignes de points. Ces lignes sont séparées de $15 \mu\text{m}$ et les points d'une même ligne sont séparés de $5 \mu\text{m}$. Chaque point a été irradié avec 15 ± 4 particules α de 3 MeV . (B) Zoom sur une partie de cette mosaïque.

La Figure 29-A montre une vue globale de la mosaïque de champs irradiés. Les différents champs adjacents irradiés grâce au déplacement du porte-échantillon sont visibles ici. La démarcation entre chaque champ correspond aux paramètres du motif choisi pour l'irradiation, créant ainsi un espace non-irradié dans le sens horizontal, et un recouvrement très léger des points irradiés dans le sens vertical. Cette démarcation entre les différents champs reste nette, et leur positionnement est régulier. Cela permet de valider les déplacements du porte-échantillon pour ce type d'irradiation.

La Figure 29-B montre une vue rapprochée de l'un des champs irradiés, et montre donc les détails de l'irradiation en réseau. Quelques particules apparaissent en dehors des motifs du réseau, et sont vraisemblablement issues d'une diffusion hors axe d'une partie infime du faisceau. Ces quelques particules exceptées, les points constituant le motif du réseau sont bien séparés, et leur positionnement suit précisément les paramètres choisis lors de l'irradiation. Le positionnement électrostatique du faisceau d'ions est donc valide pour l'irradiation d'échantillons.

1.2. Taille de faisceau

L'utilisation de détecteurs de traces de type CR39 permet également une première estimation de la taille du faisceau d'ions après son extraction à l'air. En effet, un certain nombre de particules étant déposé en chaque point d'une irradiation, la dispersion de leurs traces autour du point central nous renseigne sur la dispersion spatiale du faisceau à son entrée dans le CR39.

La Figure 29-B montre le détail d'une irradiation en réseau avec 15 ± 4 particules α de 3 MeV sur chaque point. Au sein d'une même ligne de ce motif, chaque point est séparé de $5 \mu\text{m}$. Sur le CR39, chaque point peut être distingué de ses voisins, et il est possible de mesurer leur taille. Nous avons ainsi mesuré, pour des particules α , au vu du faible nombre de particules dispersées hors axe, que 99% des particules sont situées dans un cercle de moins de $5 \mu\text{m}$ de diamètre.

La Figure 30 montre deux CR39 après irradiation par des particules α et par des protons de 3 MeV. Ces détecteurs de traces ont été irradiés tous deux suivant un motif régulier de points séparés de 30 μm .

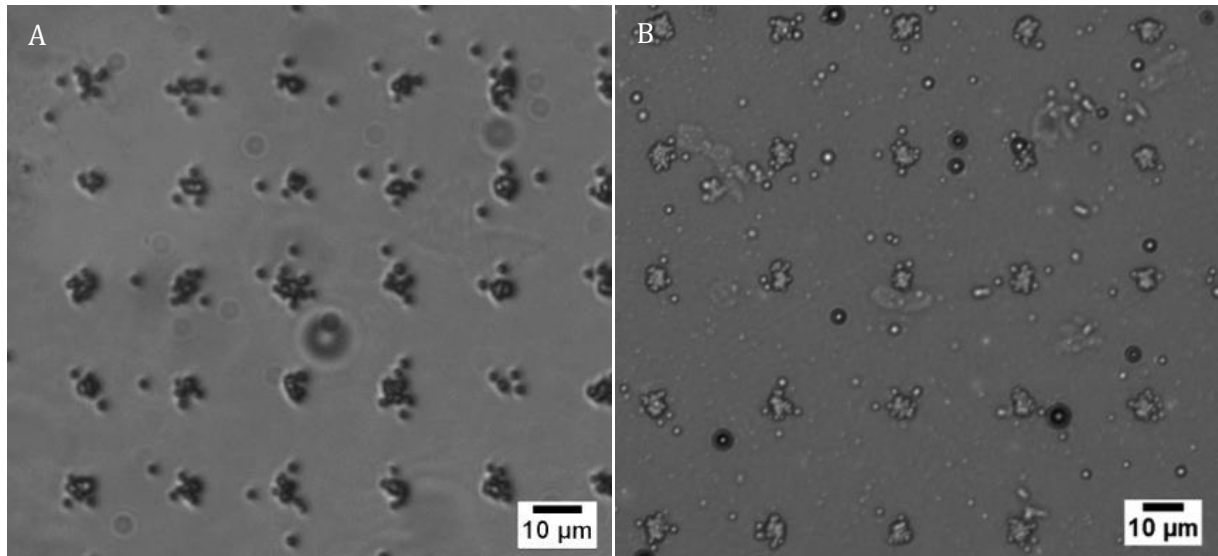


Figure 30 : Irradiations de détecteur de traces (CR39). (A) 14 ± 3 particules α de 3 MeV ont été déposées suivant un réseau de points séparés de 30 μm . (B) 120 ± 19 protons de 3 MeV ont été déposés suivant le même motif. Ces irradiations permettent d'estimer la taille du faisceau à l'air inférieure à 5 μm .

Cette figure montre donc une comparaison entre l'irradiation de CR39 par des particules α et par des protons. Les mesures de taille des points irradiés montrent un résultat similaire pour les deux types de particules, soit 99% des particules à l'intérieur d'un cercle de moins de 5 μm de diamètre.

2. Irradiation en réseau d'une population cellulaire

L'irradiation en réseau, illustrée sur détecteur de traces sur la Figure 29, est simple à mettre en œuvre et permet d'irradier rapidement un grand nombre de cellules. Associé à la fonction d'irradiation de plusieurs champs de microscope via la mosaïque, ce mode permet d'irradier la totalité d'un puits de culture en quelques dizaines de minutes.

Les rayonnements ionisants sont connus pour endommager la molécule d'ADN de manière directe via la formation de dommages simple- et double-brin, et de manière indirecte via la formation d'espèces radicalaires. Les conséquences des dommages ADN directs, et notamment des cassures double-brin, peuvent être visualisées par immunomarquage en détectant par exemple les formes phosphorylées de l'histone H2AX et de la protéine ATM. Afin de montrer la capacité de notre système de générer des dommages ADN au sein d'une population de cellules vivantes, nous avons utilisé ce mode d'irradiation pour irradier un grand nombre de cellules au sein d'un même puits. Ces cellules ont été irradiées suivant les mêmes paramètres que le CR39 de la Figure 29 : plusieurs champs adjacents irradiés selon un réseau de lignes espacées de 15 μm et

constituées de points espacés de 5 μm . Chaque point a été irradié avec 15 ± 4 particules α de 3 MeV. La Figure 31 montre le résultat de cette irradiation avec les immunomarquages des formes phosphorylées des protéines H2AX et ATM.

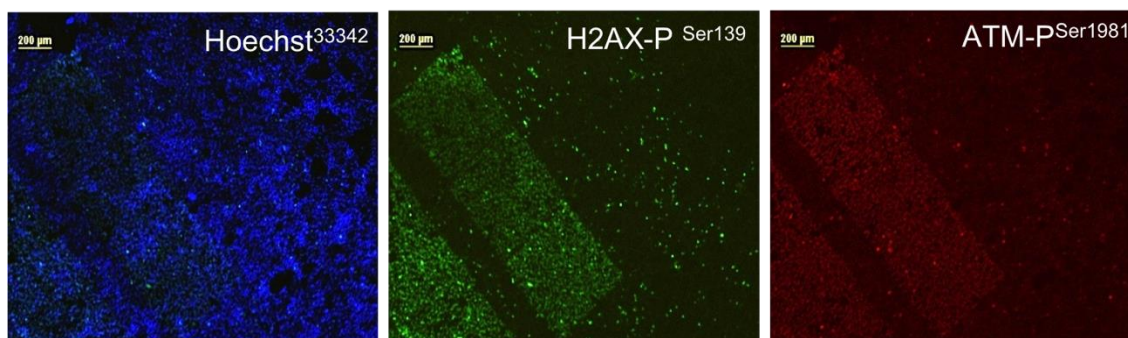


Figure 31 : Irradiation en réseau de cellules HeLa en mode mosaïque et visualisation des conséquences des cassures ADN double-brin. Différents champs adjacents ont été irradiés suivant un réseau de 130x35 points, formant ainsi des lignes de points. Ces lignes sont séparées de 15 μm et les points d'une même ligne sont séparés de 5 μm . Chaque point a été irradié avec 15 ± 4 particules α de 3 MeV. Les cellules ont été fixées 1h après irradiation, marquées avec du Hoechst 33342 (bleu), et immunomarquées contre les formes phosphorylées de l'histone H2AX (vert), et de la protéine ATM (rouge). Échelle : 200 μm

Cette figure montre une vue globale du puits de culture après irradiation. Cela permet de distinguer les zones irradiées, où les immunomarquages sont clairement visibles, des zones non-irradiées, où les marquages sont absents. Cette figure montre que l'irradiation en réseau nous permet d'atteindre, dans ces conditions, environ 10 000 cellules en une dizaine de minutes, avec une dose homogène à l'échelle de la population cellulaire.

La Figure 32 montre le détail des immunomarquages des formes phosphorylées de H2AX et ATM après irradiation suivant les mêmes paramètres, à l'échelle d'une cellule.

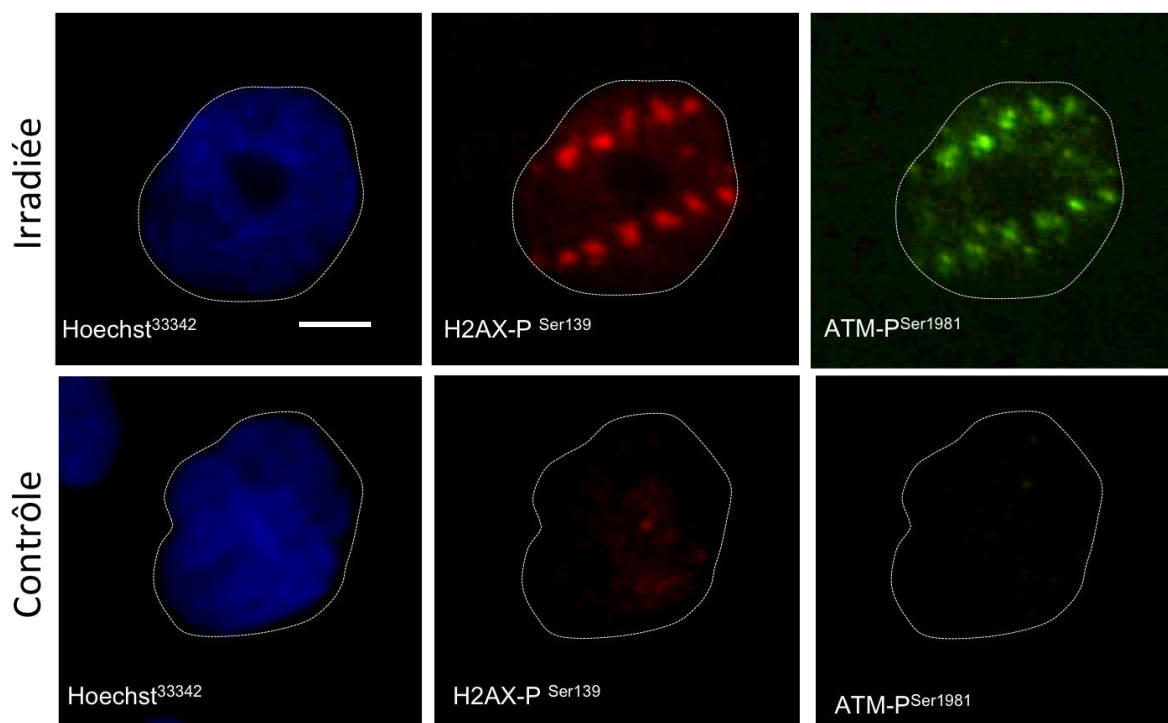


Figure 32 : Visualisation des dommages ADN double-brin après irradiation de cellules en réseau. Les lignes du réseau sont séparées de 15 μm et les points d'une même ligne sont séparés de 5 μm . Chaque point a été irradié avec 15 ± 4 particules α de 3 MeV. Les cellules ont été fixées 30 min après irradiation. Elles ont ensuite été marquées avec du Hoechst 33342 (bleu), et immunomarkées contre les formes phosphorylées de l'histone H2AX (rouge) et de la protéine ATM (vert). Échelle : 10 μm .

Sur cette figure, comme sur détecteur de traces, il est possible de distinguer les points constituant le réseau choisi pour l'irradiation. Ceci permet de mesurer la taille des zones endommagées par le faisceau, qui est directement liée à celle du faisceau d'ions. Les points sont ici plus petits que sur CR39, où la taille des traces dépend fortement de l'attaque chimique. Ce qui est observé ici n'est pas le faisceau lui-même, mais les dommages biologiques. Toutefois, cela permet de confirmer que le faisceau de particules α a un diamètre inférieur à 5 μm , et entraîne des dommages de l'ordre de 2 à 3 μm de diamètre. Dans le cas d'irradiations cellulaires avec des protons, dont les conséquences sont visibles sur la Figure 34, la taille des dommages est encore inférieure, de l'ordre de 1 μm de diamètre.

En résumé, l'irradiation en réseau permet l'irradiation d'un grand nombre de cellules au sein d'une population avec une bonne reproductibilité et une dose déposée uniforme. Ceci est très intéressant pour mener des études nécessitant un grand nombre d'échantillons irradiés, comme par exemple l'étude d'instabilités génétiques liées à l'irradiation. Ainsi, ce mode d'irradiation offre un intermédiaire entre l'irradiation « classique » avec sources radioactives, où l'irradiation est globale, avec une dose uniforme, et l'irradiation ciblée à l'échelle cellulaire, qui offre un contrôle précis du compartiment cellulaire irradié et de la dose déposée, mais ne permet pas d'irradier un aussi grand nombre de cellules dans des temps raisonnables.

3. Irradiation ciblée et précision de tir

L'irradiation ciblée permet un contrôle précis du compartiment cellulaire irradié. Ainsi, les cibles à irradier sont choisies manuellement par l'utilisateur ou reconnues automatiquement par traitement d'image. Le faisceau est positionné sur celles-ci durant un temps défini, ou jusqu'à ce que le nombre de particules prédéfini soit détecté. La qualité de l'irradiation ciblée est donnée par la précision de tir du système considéré. Elle est définie comme la distance entre le point visé et le point d'impact réel du faisceau.

3.1. Évaluation de la précision de tir sur détecteur de traces

Dans un premier temps, cette précision de tir a été évaluée sur détecteur de traces. Pour cela, la méthode d'irradiation en deux temps décrite dans le chapitre A-4 et similaire à celle utilisée sur différentes installations (Peng *et al* 2001, Heiss *et al* 2006) est mise en œuvre. La Figure 33 présente les points ciblés lors de la deuxième irradiation ainsi que le résultat de celle-ci.

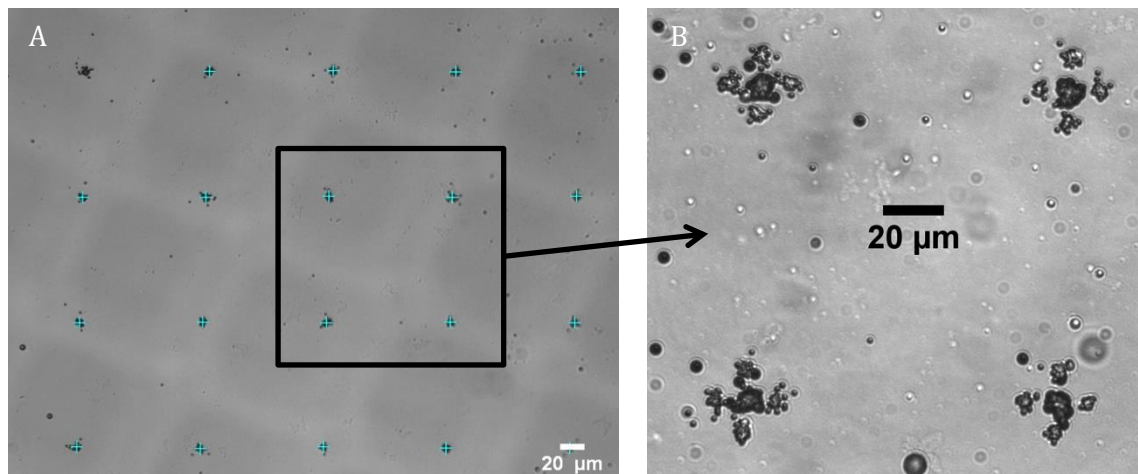


Figure 33 : Estimation de la précision de tir du système sur détecteur de traces. Le CR39 est irradié en deux temps. (A) Points issus d'une première irradiation, par des particules α de 3 MeV, et utilisés comme cibles pour (B) une deuxième irradiation selon un motif en croix de 5 points espacés de 10 μm . 14 ± 3 particules α ont été délivrées sur chaque point à chaque irradiation. Le point central, plus sombre, a donc été irradié deux fois.

La Figure 33-B permet d'estimer la précision de tir du système. Au centre des croix se trouve le point-cible, plus sombre car irradié deux fois. Cette figure montre une bonne précision de tir du système avec une distance entre le point ciblé et le point irradié inférieure à 5 μm . Ce résultat est cependant majorant car l'utilisation de CR39 (notamment en raison de l'attaque chimique effectuée et de la taille des traces révélées) ne permet pas d'obtenir une valeur plus précise. De plus, l'irradiation de détecteurs de traces n'est pas complètement représentative d'une irradiation de cellules maintenues dans leur milieu. En effet, les phénomènes de réfraction de la lumière, prenant place aux interfaces entre le puits de culture et l'air, peuvent entraîner un décalage entre la position d'une cible sur l'image et sa position réelle et ainsi dégrader la précision de tir. Ce phénomène n'entre pas en ligne de compte avec le CR39. Une valeur plus réaliste de la précision de

tir du système doit donc être mesurée sur cellules. Pour cela, nous avons tout d'abord utilisé l'immunodétection de protéines liées à la réponse aux cassures de l'ADN, comme l'histone H2AX phosphorylée, qui permet de visualiser les conséquences de l'irradiation sur un noyau cellulaire (Heiss *et al* 2006).

3.2. Évaluation de la précision de tir par immunomarquage de noyaux cellulaires

La micro-irradiation ciblée de noyaux cellulaires avec un faisceau de protons de 3 MeV, selon un motif en croix de 5 points et de 10 μm de large, a donc été entreprise. Afin de visualiser les dommages générés, les cellules HeLa ont été fixées après irradiation et immunomarquées pour détecter l'histone H2AX phosphorylée (γ -H2AX).

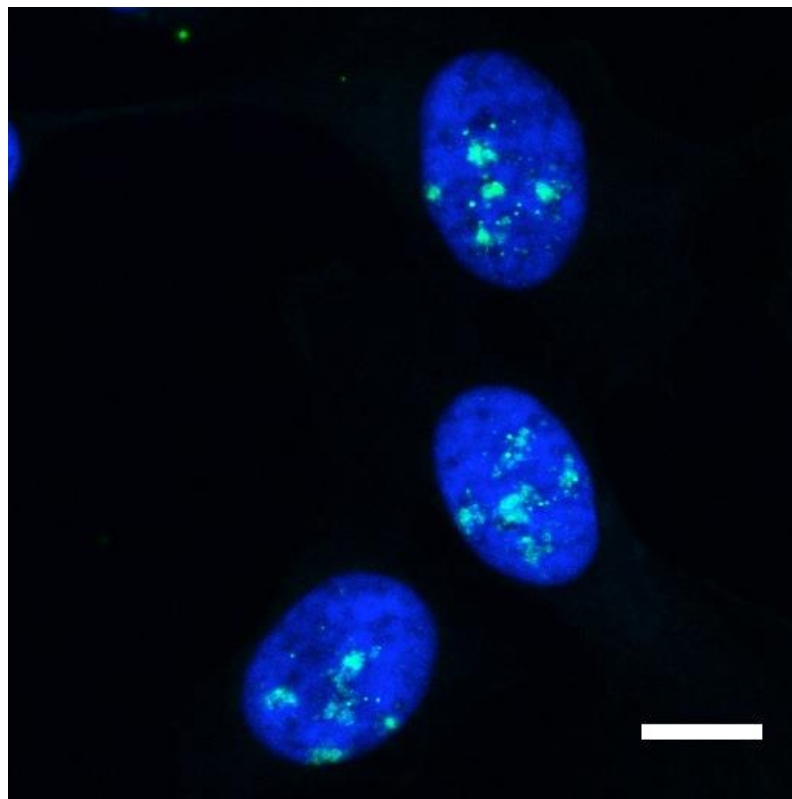


Figure 34 : Cassures ADN double-brin induites par l'irradiation ciblée des barycentres de noyaux de cellules HeLa par des protons de 3 MeV. Les noyaux sont marqués avec du Hoechst 33342 (bleu), et immunomarqués contre la forme phosphorylée de l'histone H2AX (vert). Chaque noyau est ciblé en son centre et irradié en 5 points selon un motif en croix de 10 μm de large. 100 ± 10 protons sont délivrés sur chaque point. Les cellules ont été fixées 2h après l'irradiation. Barre d'échelle : 10 μm .

La Figure 34 montre des immunomarquages γ -H2AX suite à l'irradiation ciblée. Ce résultat illustre la précision de tir typiquement obtenue en condition d'irradiation cellulaire (puits de culture rempli de milieu). Là aussi, les points impactés sont situés à moins de 5 μm des points ciblés. Cette méthode permet de confirmer que la précision de tir est suffisante pour irradier sélectivement un noyau cellulaire mais ne permet pas de déterminer rigoureusement cette précision. En effet, un laps de temps de l'ordre d'une heure est nécessaire entre l'irradiation et la fixa-

tion des cellules (temps caractéristique de la phosphorylation de H2AX), avec des mouvements cellulaires possibles pendant ce temps. Par ailleurs des mouvements cellulaires ou chromatiniens sont également possibles durant la fixation elle-même. Ces mouvements entraînent alors un mouvement des zones endommagées au sein des noyaux, et donc un décalage par rapport à la zone initialement ciblée et irradiée.

3.3. Mesure de la précision de tir par vidéomicroscopie en ligne

Afin de pallier à ce problème, il est nécessaire de pouvoir visualiser les conséquences de la micro-irradiation le plus tôt possible. Les techniques de vidéomicroscopie en ligne offrent une alternative intéressante puisqu'elles permettent de visualiser la dynamique de protéines réagissant quelques secondes après l'irradiation. En effet, dans ce cas, les mouvements chromatiniens restent limités, et aucune fixation ne risque d'induire d'autres mouvements non désirés. Dans ces travaux, nous avons utilisé la protéine XRCC1. Cette protéine est impliquée dans un grand nombre de mécanismes de réparation de l'ADN, notamment la réparation des cassures simple-brin (Brem and Hall 2005, Caldecott 2003). Son principal intérêt pour caractériser la précision de tir est le fait qu'elle est recrutée sur les sites endommagés de l'ADN quelques secondes seulement après irradiation (Mortusewicz and Leonhardt 2007). Nous avons utilisé des cellules HeLa transfectées pour exprimer XRCC1 couplée à la GFP.

Les noyaux de ces cellules expriment la protéine XRCC1-GFP uniformément avant irradiation, ce qui permet leur ciblage. Après irradiation, la fluorescence vient se concentrer sur les sites des dommages ADN. Nous avons donc ciblé puis irradié ces noyaux cellulaires selon un motif en croix de 5 points et de 10 μm de large, et l'évolution de la fluorescence a été enregistrée par vidéomicroscopie. La Figure 35 montre d'une part le ciblage de noyaux cellulaires au sein d'un champ de microscope, et d'autre part la relocalisation de la protéine XRCC1-GFP sur les sites endommagés 1min30 après irradiation par 1000 ± 30 protons de 3 MeV.

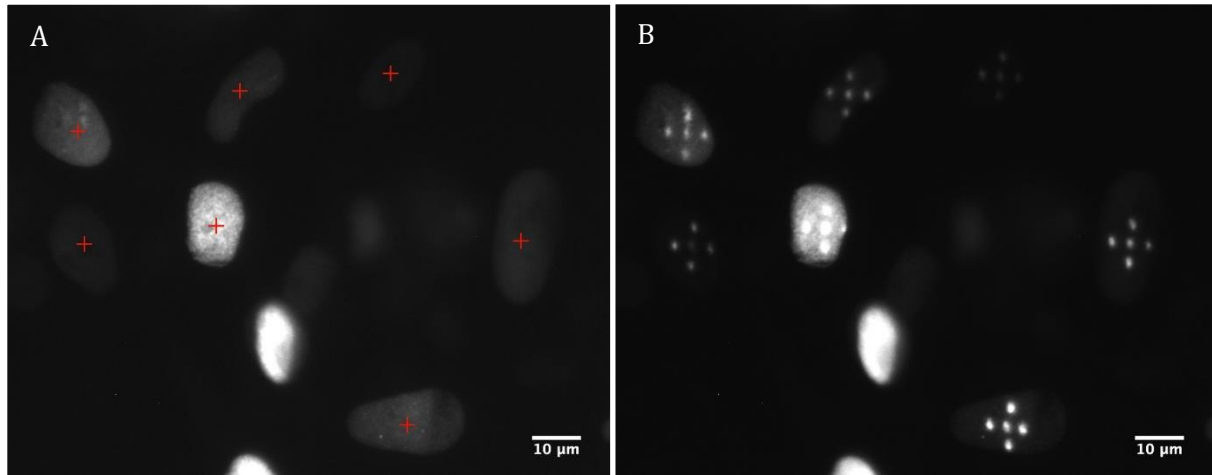


Figure 35 : Mesure de la précision de tir du système sur cellules. (A) Champ de microscope présentant des noyaux de cellules HeLa exprimant la protéine XRCC1-GFP. Les noyaux ciblés pour irradiations sont marqués d'une croix rouge. (B) Même champ de microscope 1min30 après irradiation ciblée suivant un motif en croix de 5 points et de 10 µm de large. 1000 \pm 30 protons de 3 MeV ont été déposés sur chaque point.

Cette figure illustre notre capacité à visualiser, cibler et micro-irradier des cellules vivantes dans leur milieu de culture avec un nombre moyen de particules, puis à suivre en temps réel la dynamique de protéines d'intérêt et ce sans avoir à déplacer le puits de culture. La précision de tir du dispositif d'irradiation peut alors être déterminée en mesurant la distance moyenne entre le point ciblé et le centre du motif en croix apparaissant dans le noyau après irradiation. Sur 20 noyaux cellulaires, les points irradiés sont situés dans un cercle de rayon moyen de $2,0 \pm 0,7$ µm autour du point ciblé

La précision de tir du système de micro-irradiation permet donc de cibler sélectivement des noyaux cellulaires mais également de délivrer les particules suivant un motif géométrique d'une taille comparable à celle du noyau (cf. Figure 35). Cette précision permet également d'envisager le ciblage de structures plus petites qu'un noyau de cellule humaine comme par exemple les noyaux embryonnaires du nématode *C. elegans* (cf. chapitre F). On peut enfin noter que la précision de tir de ce système est comparable à celle mesurée sur d'autres systèmes similaires (Peng *et al* 2001, Greif *et al* 2006, Hable *et al* 2009, Merchant *et al* 2012).

4. Contrôle du nombre de particules déposées

Un système de détection en amont du puits de culture est indispensable si l'on veut un contrôle absolu de la dose délivrée lors de l'irradiation, sans possibilité d'utiliser la photodiode PIN pour détecter les ions après le puits de culture. Ce système doit présenter une efficacité de détection très proche de 100%, tout en ne dégradant pas la résolution spatiale du faisceau de manière trop importante. Un compromis entre efficacité de détection et influence sur le faisceau d'ions doit donc être trouvé.

Deux systèmes de détection ont été développés pour les deux types de particules de la ligne microfaisceau. Un détecteur à base de scintillateurs pour la détection des protons, et un détecteur d'électrons secondaires pour détecter les particules α . Des tests d'efficacité de détection ont été menés sur ces détecteurs, ainsi que des mesures de taille de faisceau sur détecteur de traces.

4.1. Détecteur à scintillation

Dans la plupart des installations similaires utilisant des protons à de telles énergies, la détection des ions en transmission se fait au moyen d'un système basé sur des scintillateurs plastiques minces, du type BC400 (Folkard *et al* 1997a, Greif *et al* 2004, Khodja *et al* 2009). Par ailleurs, un tel dispositif de contrôle des ions avait été mis en place avec succès sur l'ancienne version de la ligne d'irradiation du CENBG (Barberet *et al* 2005). Dans le cadre de cette thèse, un nouveau design pour la détection des protons via un scintillateur mince (10 μm d'épaisseur) a été mis en place et évalué afin d'optimiser son utilisation et son efficacité, tout en limitant son influence sur la résolution spatiale du faisceau d'ions.

Le dispositif de détection ainsi que la chaîne d'acquisition sont décrits dans le chapitre A-3.2.1. Les mesures ont été effectuées avec un faisceau de protons de 3 MeV.

Le bruit de fond détecté dans ces conditions, après un calfeutrage minutieux de l'étage terminal de la ligne afin de minimiser les entrées de lumière parasite, est de 50 ± 10 coups/s. Ce taux de comptage varie peu avec la polarisation des photomultiplicateurs. Le flux typique du faisceau lors de l'irradiation étant situé aux alentours de 1500 protons/s. Le bruit de fond mesuré signifie donc un nombre de « faux positifs » de l'ordre de 3%.

L'efficacité de détection a été mesurée en effectuant plusieurs comptages successifs de 30 s des signaux délivrés par la photodiode, et par le système à scintillation. Sur ce système, elle est de $98\% \pm 1\%$ par rapport au taux de comptage de la photodiode silicium.

La taille du faisceau de protons a été évaluée par irradiation de CR39. Afin de minimiser l'éclatement du faisceau dans l'air, le CR39 a été placé le plus près possible de la fenêtre d'extraction du faisceau. La distance entre la sortie du faisceau à l'air et l'échantillon est alors de 130 μm . Cette distance est principalement due à la différence de pression entre l'air et le vide de la ligne de faisceau, qui entraîne une déformation des feuilles de scintillateur et de Mylar utilisées pour l'extraction du faisceau à l'air (cf. Figure 36).

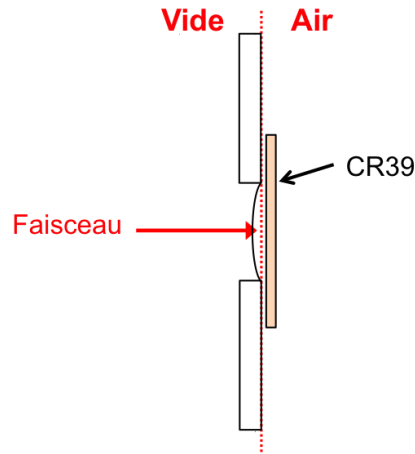


Figure 36 : Représentation de la déformation de la fenêtre d'extraction par la différence de pression entre l'air et le vide de la ligne. Le creusement de la fenêtre empêche de placer le CR39 au contact avec le point d'extraction du faisceau.

Le CR39 a été irradié suivant un réseau de points séparés de 40 μm . Chaque point a été irradié avec 100 protons mesurés par détecteur à scintillation ou, en son absence, estimés à partir du temps d'irradiation. La Figure 37 montre une comparaison entre l'irradiation de CR39 sans détecteur en transmission, et l'irradiation en présence du détecteur à scintillation.

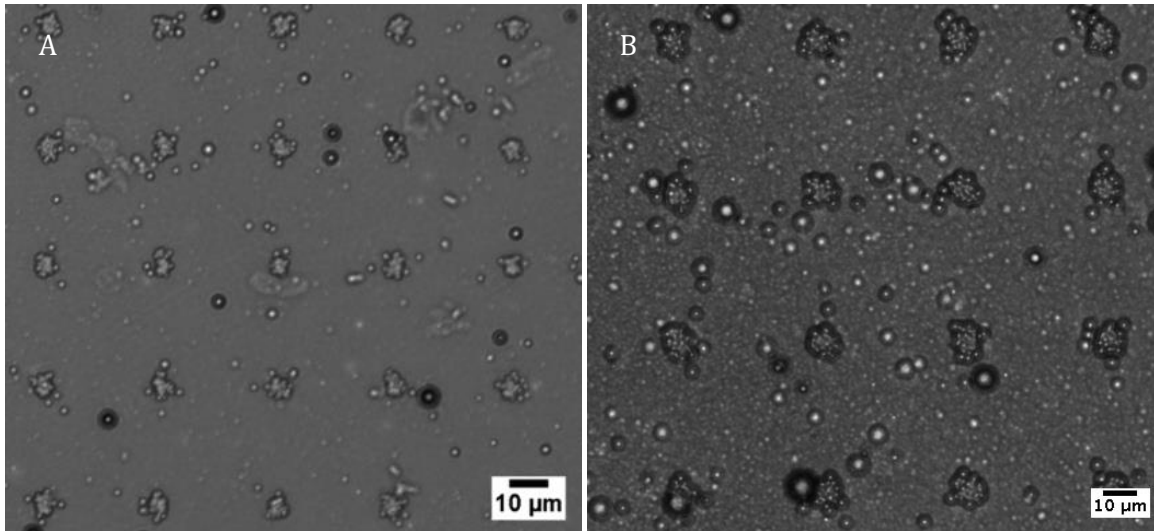


Figure 37 : Irradiations de détecteur de traces (CR39) avec ou sans système de détection à scintillation. (A) 120 ± 19 protons de 3 MeV ont été déposés suivant un réseau de points séparés de 30 μm sans système de détection. (B) 100 protons de 3 MeV ont été déposés suivant un réseau de points séparés de 40 μm avec détection du nombre de particules par le système à scintillation. Le diamètre mesuré du faisceau est de $8,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$ en présence du système de détection à scintillation.

Cette figure montre que la présence du scintillateur plastique, et donc l'épaisseur de matière plus importante traversée par le faisceau d'ions avant d'atteindre l'échantillon, induit un éclatement plus important du faisceau par rapport à une extraction « classique » par une fenêtre de Si_3N_4 . La couche d'air résiduelle entre le point d'extraction du faisceau et l'échantillon, d'une épaisseur minimale de 130 μm dans notre cas, influe également de manière importante sur le

diamètre du faisceau. L'irradiation de détecteur de traces permet de mesurer la taille du faisceau dans cette configuration : 99% des particules se situent dans un cercle de $8,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$ de diamètre (largeur à mi-hauteur de $3,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$), soit une augmentation de la taille du faisceau par rapport aux mesures sur CR39 sans système de détection.

Le système de détection à scintillation présente donc une très bonne efficacité de détection pour les protons de 3 MeV. Le bruit de fond est réduit et peut encore être amélioré en agissant sur le calfeutrage de l'étage terminal de la ligne. En ce qui concerne la taille de faisceau, celle-ci est compatible avec l'irradiation cellulaire, mais des ajustements au niveau de la géométrie du système peuvent encore être faits afin de permettre d'approcher l'échantillon encore plus près de la fenêtre d'extraction, ce qui réduirait sensiblement le diamètre du faisceau.

4.2. Détecteur d'électrons secondaires

Pour la détection des particules α , l'utilisation des scintillateurs minces n'est pas adaptée. En effet, l'épaisseur de $10 \mu\text{m}$ de scintillateur dégrade de manière importante la taille du faisceau à son entrée dans l'échantillon. Par ailleurs, il n'est pas possible d'obtenir facilement des films de BC400 plus fins que $10 \mu\text{m}$. Un autre système doit donc être étudié. Pour la détection d'ions lourds de haute énergie, le système de micro-irradiation basé à GSI (Darmstadt, Allemagne) utilise un système de détection d'électrons secondaires (Heiss *et al* 2006). Dans le cadre des travaux de cette thèse, l'adaptation de ce système à la détection des particules α a été étudiée.

Le dispositif de détection et la chaîne d'acquisition sont décrits dans le chapitre A-3.2.2. Les mesures ont été effectuées avec un faisceau de particules α de 3 MeV.

Les tests du détecteur d'électrons secondaires (ou channeltron) ont été menés en deux phases. Tout d'abord, il a fallu travailler sur l'optimisation de la collecte des électrons secondaires émis en surface de la fenêtre d'extraction lors du passage des particules α . La géométrie de la zone autour de la fenêtre d'extraction a donc été conçue afin que les lignes de champ issues du channeltron, présentant une tension positive, passent au plus près de la fenêtre, capturant ainsi un maximum d'électrons. La mise en place d'un système de grille de polarisation, placée à l'entrée du channeltron, a également permis d'optimiser leur collecte et ainsi d'améliorer l'efficacité de détection.

Celle-ci a dans un premier temps été mesurée avec une fenêtre d'extraction en Si_3N_4 « nue », c'est à dire sans dépôt de matière. Ces tests, réalisés en effectuant plusieurs comptages de 30 s avec la diode, et le détecteur d'électrons secondaires, ont montré une efficacité de détection médiocre, de l'ordre de 55 % pour des particules α de 3 MeV.

La Figure 38 montre l'irradiation d'un détecteur de traces par des particules α suivant un réseau régulier de points séparés de 20 μm . Chaque point du réseau doit être irradié avec une seule particule α , détectée par le channeltron.

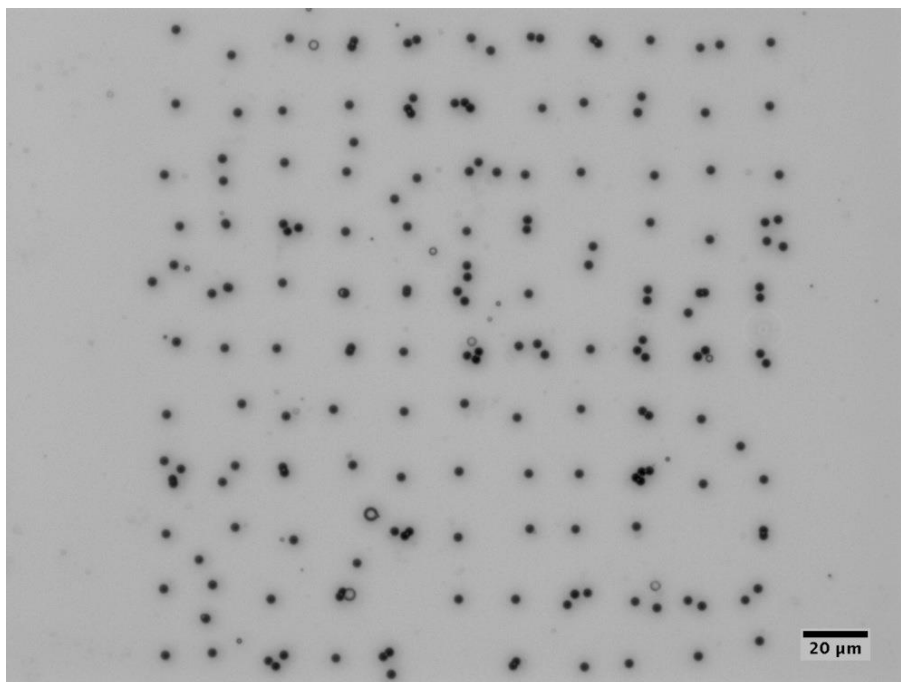


Figure 38 : Tests de l'efficacité de détection du détecteur d'électrons secondaires sur CR39. L'irradiation s'est faite suivant un réseau de 11x11 points espacés de 20 μm . Chaque point du réseau ne devant recevoir qu'une particule α , détectée par le channeltron. Chaque petit point correspond à la trace d'une particule α .

Cette figure montre que seul 55% des points ont été irradiés avec une seule particule α . Le reste présente les traces de deux particules, voire davantage. Ceci confirme l'efficacité de détection mesurée par rapport au signal de la photodiode.

Le seul moyen d'améliorer l'efficacité de détection, après avoir optimisé la collecte d'électrons, est l'amélioration de l'émission des électrons par la fenêtre d'extraction. Pour cela, la présence d'un dépôt de matière à sa surface semble indispensable. Des fenêtres d'extraction en Si_3N_4 présentant un dépôt fin de CsI nous ont été fournies par l'équipe microfaisceau de GSI (Darmstadt, Allemagne). Nous les avons testées avec des particules α de 3 MeV, avec une efficacité de détection entre 80% et 85%, soit nettement plus qu'avec des fenêtres d'extractions sans dépôt. Ce résultat montre une grande influence du dépôt de matière sur l'émission d'électrons secondaires. Il est cependant encore insuffisant pour une détection fiable du nombre de particules α envoyé sur les cellules, mais reste préliminaire et doit être confirmé pour mener à d'éventuelles optimisations ultérieures.

E – IRRADIATION DE NOYAUX CELLULAIRES ET VIDÉOMICROSCOPIE

La ligne de micro-irradiation a été conçue pour permettre de réaliser des micro-irradiations ciblées d'échantillons biologiques vivants à l'échelle cellulaire, et à l'échelle multicellulaire. La micro-irradiation à l'échelle cellulaire *in vitro* et l'utilisation de protéines couplées à un fluorochrome ainsi qu'à la vidéomicroscopie permettent d'étudier la cinétique de mécanismes de détection et de réparation des dommages ADN radio-induits, quelques minutes après l'irradiation. Par ailleurs, l'évaluation de l'énergie déposée par modélisation numérique permet de caractériser l'irradiation et ainsi d'interpréter les phénomènes biologiques observés.

Après une présentation préliminaire de la modélisation de la micro-irradiation par faisceau d'ions à l'échelle cellulaire, ce chapitre présentera les résultats obtenus avec deux protéines différentes : la protéine XRCC1, qui permet de mettre en place la méthode d'irradiation et d'analyse des données de vidéomicroscopie, et la protéine OGG1, marqueur de dommages ADN indirects.

1. Modélisation de l'irradiation par microfaisceau d'ions à l'échelle cellulaire

La modélisation numérique de la micro-irradiation par faisceau d'ions permet d'étudier précisément l'énergie déposée par les ions dans un noyau cellulaire. Plusieurs données peuvent ainsi être obtenues notamment la quantité d'énergie déposée et la topologie de la zone irradiée. Il est alors possible de calculer la dose globale, absorbée dans la totalité du noyau cellulaire, et la dose locale absorbée uniquement dans la zone irradiée. Ces données sont ensuite utilisées pour interpréter les phénomènes biologiques observés après irradiation. La méthode et les codes utilisés pour cette modélisation sont décrits dans le chapitre C-1.

Le fantôme cellulaire réaliste, utilisé pour la modélisation, est voxellisé, ce qui permet de calculer l'énergie déposée dans chaque voxel lors de l'irradiation. Ces données donnent accès aux trajectoires des particules au sein du noyau cellulaire, au travers de leur dépôt d'énergie. La Figure 39 montre la reconstruction tridimensionnelle du dépôt d'énergie (en rouge) de protons et de particules α de 3 MeV au sein d'un modèle réaliste de noyau cellulaire (en vert). La modélisation a été effectuée pour une dose absorbée de 15,4 Gy dans la totalité du noyau.

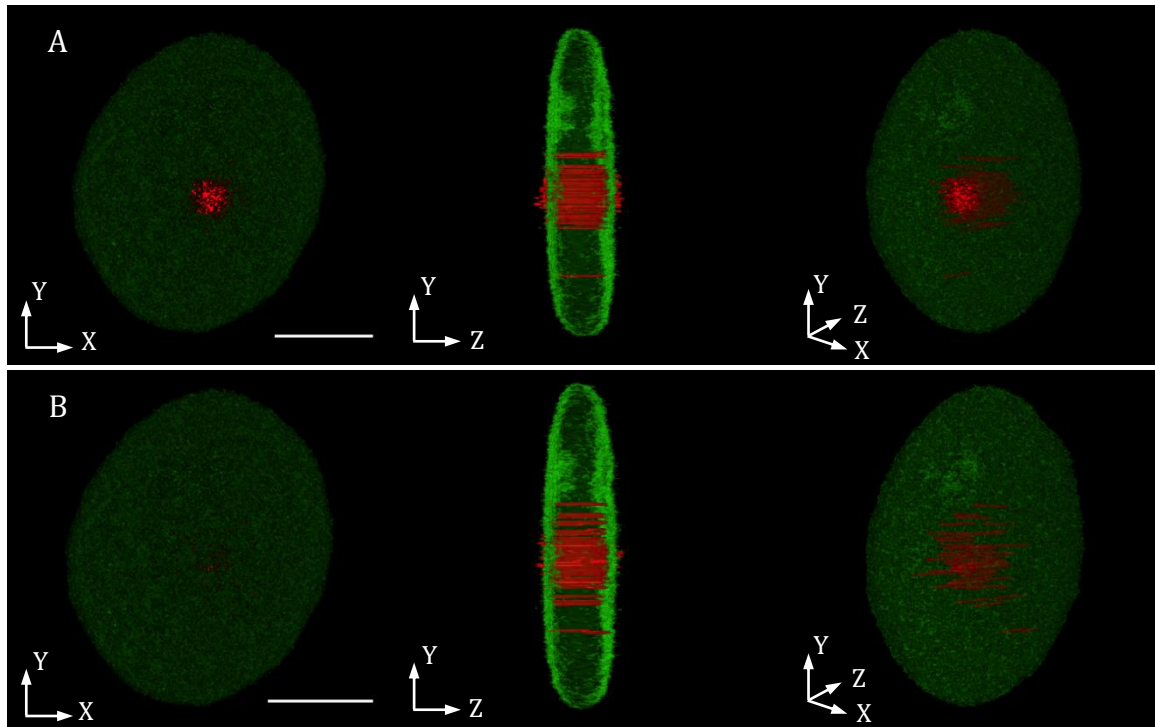


Figure 39 : Modélisation de la distribution spatiale du dépôt d'énergie lors de l'irradiation par microfaisceau d'ions. Le dépôt d'énergie (rouge) a été modélisé dans des fantômes nucléaires réalistes (vert) avec la même dose globale absorbée de 15,4 Gy. (A) Irradiation ciblée avec 1000 protons (3 MeV). (B) Irradiation ciblée avec 77 particules α (3 MeV). À gauche: vue de face, au centre: vue de côté, à droite: vue inclinée à 45°. Barre d'échelle : 5 μm

La dispersion plus importante des particules α dans la matière est clairement visible dans le résultat de la simulation. Cela illustre également la différence de taille entre les zones irradiées avec des protons et avec des particules α , pour une même dose absorbée au sein du noyau. La Figure 39 montre que, pour une même dose globale absorbée, le dépôt d'énergie peut varier en fonction du type de particules utilisé. Par conséquent, la quantité des dommages localement engendrés dans la trace des particules ne peut pas être reliée à une dose calculée globalement au sein du noyau. Il faut raisonner ici en termes de géométrie de la zone irradiée.

La Figure 40 représente la répartition quantitative de l'énergie déposée sur une projection en deux dimensions d'un noyau cellulaire, après irradiation par 10, 100 et 1000 protons et particules α de 3 MeV.

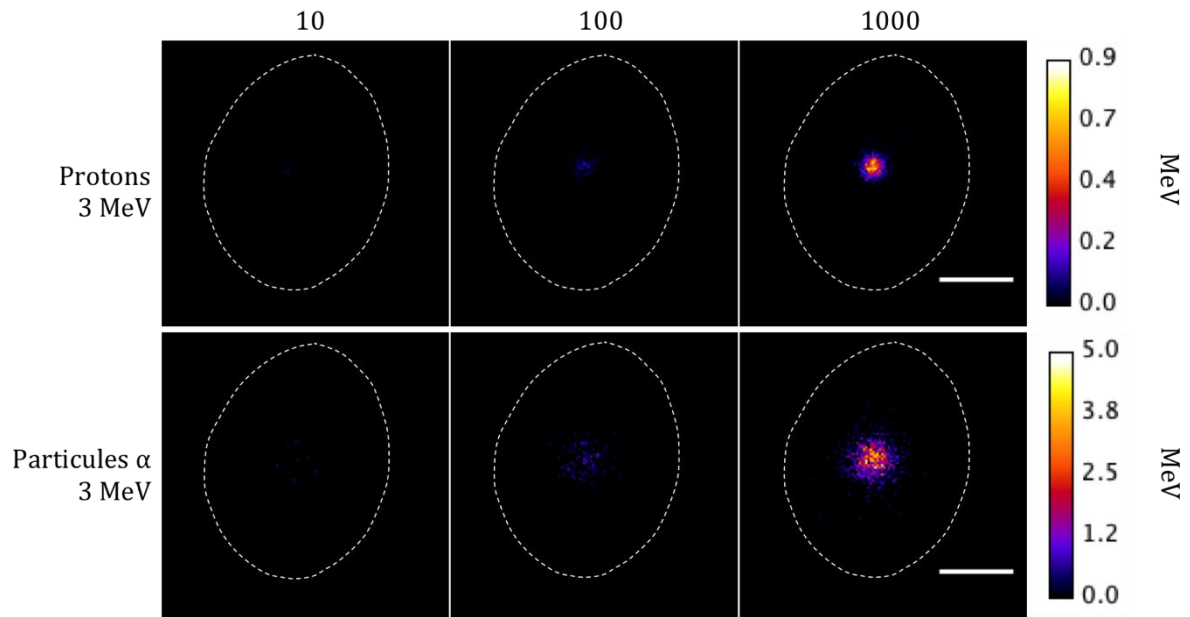


Figure 40 : Modélisation de la répartition spatiale du dépôt d'énergie lors de l'irradiation d'un noyau cellulaire par faisceau d'ions, avec des protons ou des particules α . L'échelle de couleur représente l'énergie déposée dans chaque pixel et est différente pour chaque type de particule. Barre d'échelle : 5 μm . Taille d'un pixel : 150x150 nm.

Cette figure confirme ce qui est également visible sur la Figure 39 : si les particules α déposent davantage d'énergie en traversant la matière, la surface (et par extension le volume) de ce dépôt d'énergie est bien plus important que dans le cas de protons du fait de la taille du faisceau.

Nous avons donc calculé la dose locale absorbée, c'est à dire la dose absorbée uniquement dans la zone irradiée, en tenant compte de la différence de taille de faisceau entre protons et particules α . Cette dose est calculée en normalisant l'énergie déposée par la masse d'un cylindre englobant la zone irradiée. Le diamètre de ce cylindre est fixé pour chaque type de particule et correspond à 6 fois l'écart-type de la répartition de l'énergie déposée par 10 000 particules. Sa hauteur correspond à l'épaisseur du fantôme cellulaire utilisé.

La modélisation du dépôt d'énergie permet également de déterminer la largeur à mi-hauteur de ce dépôt puisque sa répartition spatiale suit une loi normale. Cette grandeur est directement liée à la taille du faisceau et peut également être reliée aux dommages radio-induits lors de l'irradiation. Le Tableau 3 résume ces résultats.

Tableau 3 : Largeur à mi-hauteur du dépôt d'énergie calculé par modélisation de l'irradiation d'un modèle de noyau cellulaire réaliste par 10 000 particules.

Particule	Largeur à mi-hauteur du dépôt d'énergie (en μm)
Protons	$0,83 \pm 0,30$
Particules α	$1,48 \pm 0,05$

Ces valeurs sont compatibles avec les tailles de faisceau estimées lors de l'irradiation de détecteurs de traces (cf. chapitre D-1.2), et avec la taille des zones endommagées observées grâce aux immunomarquages de noyaux cellulaires irradiés (cf. chapitres D-2 et D-3.2).

Le Tableau 4 et le Tableau 5 regroupent les valeurs de doses absorbées globales et locales, calculées pour des irradiations avec des protons et des particules α de 3 MeV.

Tableau 4 : Dépôt d'énergie, dose globale et dose locale correspondantes, calculées par modélisation, pour l'irradiation d'un noyau cellulaire par des protons de 3 MeV.

Nombre de particules	Énergie déposée (en MeV)	Dose globale absorbée (en Gy)	Dose locale absorbée (en Gy)
1 proton	0,03	0,02	0,49
10 protons	0,34	0,2	4,87
100 protons	3,40	1,5	47,27
1 000 protons	34,20	15,4	475,62

Tableau 5 : Dépôt d'énergie, dose globale et dose locale correspondantes, calculées par modélisation, pour l'irradiation d'un noyau cellulaire par des particules α de 3 MeV.

Nombre de particules	Énergie déposée (en MeV)	Dose globale absorbée (en Gy)	Dose locale absorbée (en Gy)
1 particule α	0,46	0,21	2,03
10 particules α	4,62	2,1	20,13
100 particules α	45,39	20,4	197,75
1 000 particules α	452,0	203,3	1969,13

2. Visualisation en temps réel de la formation de dommages ADN radio-induits à l'échelle cellulaire

Dans cette partie sont présentés les résultats obtenus pour visualiser et caractériser le recrutement de la protéine XRCC1-GFP après micro-irradiation par des protons ou des particules α de 3 MeV. Ces données seront ensuite confrontées aux calculs dosimétriques effectués par modélisation numériques, afin d'interpréter les phénomènes biologiques observés.

2.1. Visualisation en temps réel de la relocalisation de la protéine XRCC1

La protéine XRCC1 joue un rôle important dans un certain nombre de mécanismes de réparation de l'ADN, comme la réparation par excision de base, ou la réparation des cassures simple-brin de l'ADN (Brem and Hall 2005, Caldecott 2003, Mortusewicz and Leonhardt 2007). L'intérêt de cette protéine, naturellement présente de manière homogène dans le noyau cellulaire, repose sur sa capacité à se relocaliser sur les sites ADN endommagés quelques secondes seulement après irradiation. Durant ces travaux, nous avons utilisé les propriétés de la protéine XRCC1

couplée à la GFP pour mettre au point des protocoles d'irradiation ciblée et de vidéomicroscopie, et des méthodes de mesure de la cinétique de recrutement de XRCC1-GFP après irradiation.

Les noyaux cellulaires ont été irradiés de manière ciblée en un point unique avec respectivement 10 ± 4 , 100 ± 10 et 1000 ± 30 ions (protons ou particules α) de 3 MeV. Le contrôle du nombre s'est fait via le temps d'ouverture du faisceau.

La Figure 41 et la Figure 42 montrent l'induction de la relocalisation de XRCC1-GFP après irradiation respectivement par des protons et des particules α de 3 MeV. L'irradiation a lieu 10 s après le début de l'acquisition d'images.

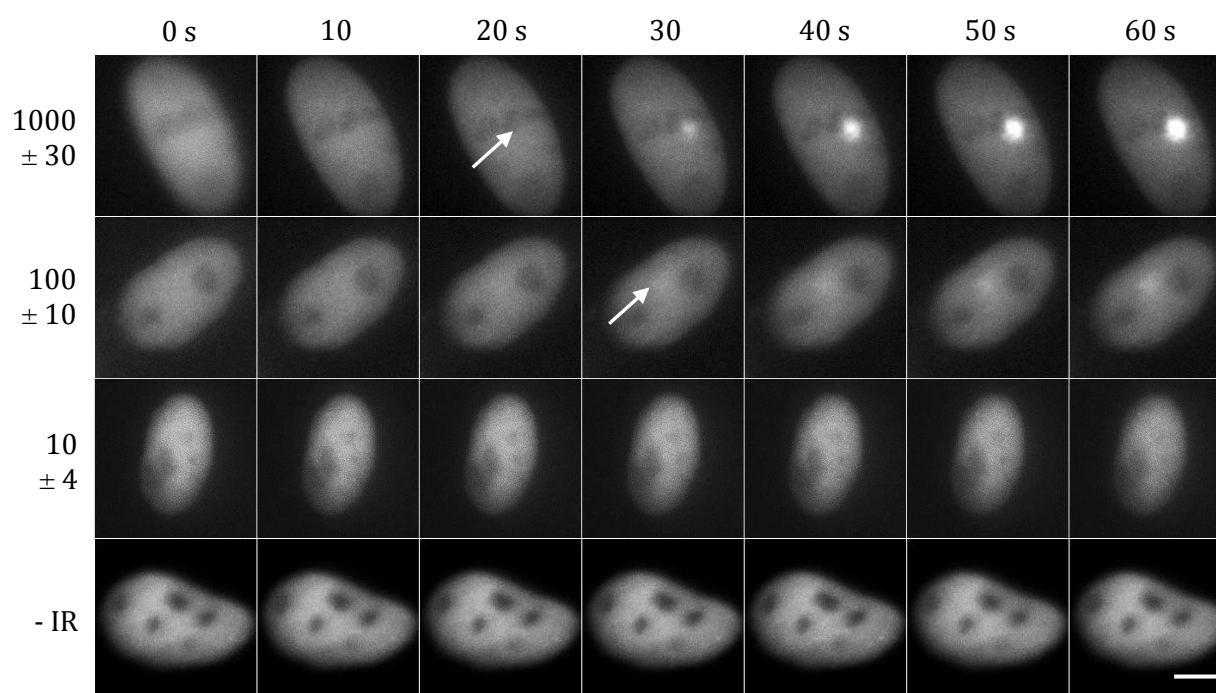


Figure 41 : Induction de la relocalisation de XRCC1 après irradiation par des protons de 3 MeV. Le recrutement de la protéine XRCC1-GFP est visualisé par vidéomicroscopie après irradiation ciblée des noyaux avec un nombre défini de protons de 3 MeV. La protéine s'accumule au niveau des sites ADN endommagés quelques secondes après irradiation (flèches blanches). Toutefois, aucune relocalisation n'est visible dans le cas d'une irradiation avec 10 ± 4 protons, ce qui indiquerait la présence d'un seuil de réaction ou de détection. L'irradiation a lieu au temps $t = 10$ s. Échelle : $10 \mu\text{m}$

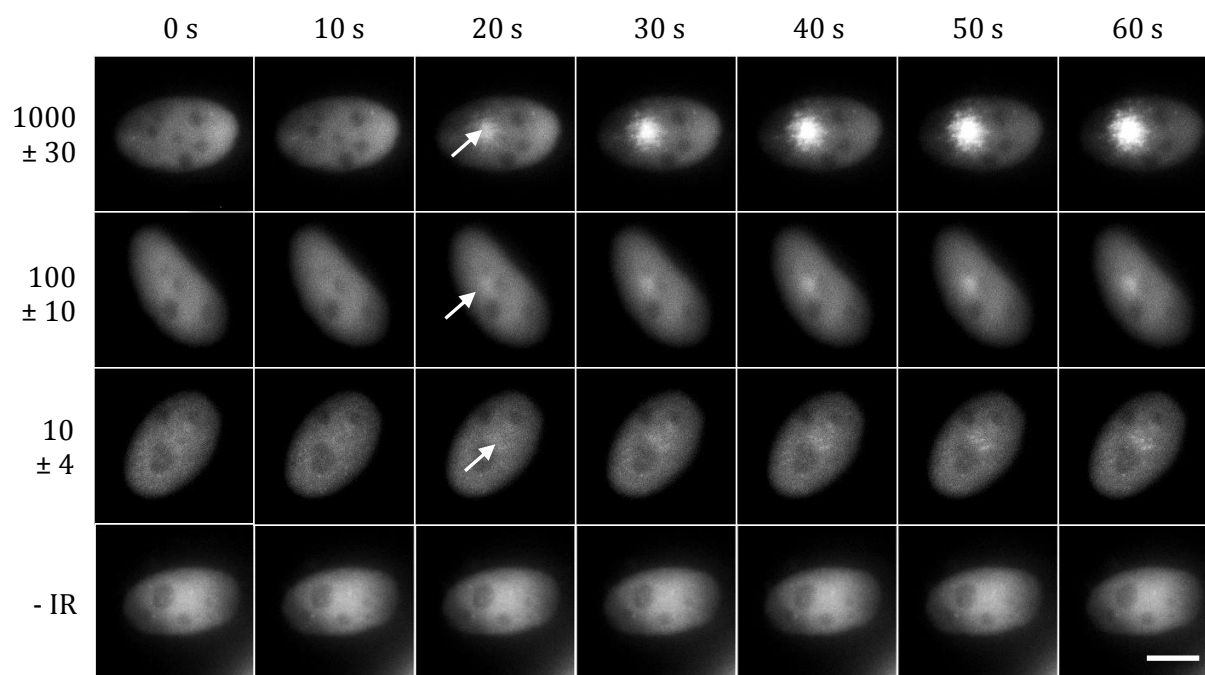


Figure 42 : Induction de la relocalisation de XRCC1 après irradiation par des particules α de 3 MeV. Le recrutement de la protéine XRCC1-GFP est visualisé par vidéomicroscopie après irradiation ciblée des noyaux avec un nombre défini de particules α de 3 MeV. La protéine s'accumule au niveau des sites ADN endommagés quelques secondes après irradiation (flèches blanches) et ce pour l'ensemble des conditions d'irradiation. L'irradiation a lieu au temps $t = 10$ s. Échelle : 10 μ m

Dans le cas de l'irradiation par particules α , il y a induction de la relocalisation de XRCC1-GFP quel que soit le nombre de particules déposées alors qu'aucune réaction de XRCC1-GFP n'est visible après irradiation avec 10 ± 4 protons. Cela indiquerait la présence d'un seuil de réaction, ou de détection, en dessous duquel la relocalisation de XRCC1 n'intervient pas ou bien n'est pas visible avec notre système.

2.2. Étude de la cinétique de relocalisation de la protéine XRCC1

Afin d'extraire des données numériques sur la cinétique de recrutement de la protéine XRCC1-GFP après irradiation, les images obtenues sont traitées selon la méthode décrite dans le chapitre B-4.1. L'évolution avec le temps de l'intensité de fluorescence est donc mesurée au sein de deux zones d'intérêt d'un noyau cellulaire : la zone irradiée et la zone non irradiée, où l'intensité de fluorescence respectivement augmente et diminue après irradiation.

La Figure 43 et la Figure 44 présentent la cinétique d'accumulation de la protéine XRCC1-GFP avec le temps dans ces deux zones après irradiation respectivement par des protons et des particules α de 3 MeV.

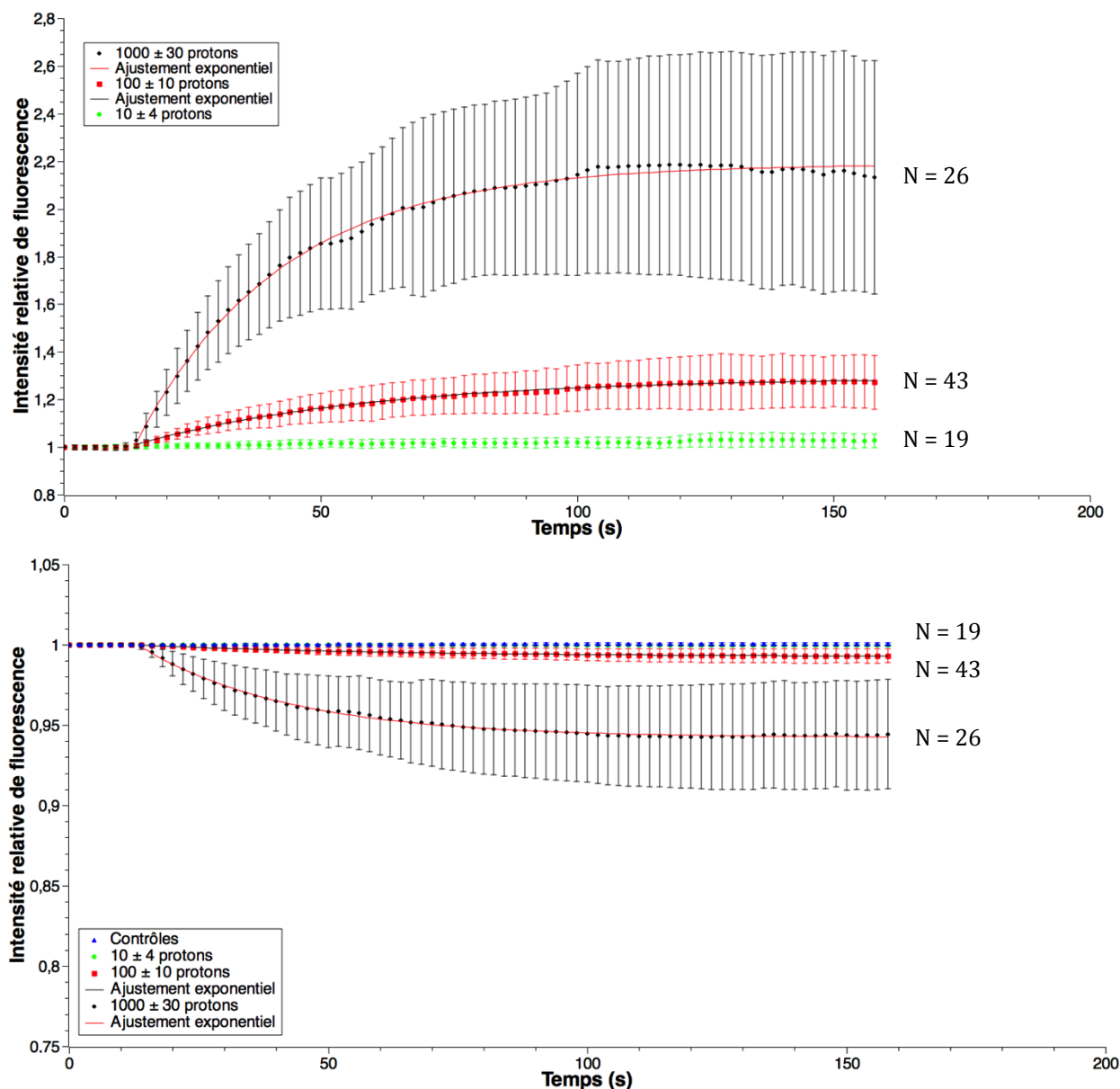


Figure 43 : Cinétique d'accumulation de la protéine XRCC1-GFP après irradiation par des protons de 3 MeV. Évolution de la fluorescence de la protéine XRCC1-GFP, exprimée au sein de la zone irradiée (graphique du haut) et non-irradiée (graphique du bas) de noyaux de cellules HeLa irradiés par des protons de 3 MeV. L'irradiation a lieu à $t = 10$ s et la relocalisation démarre à $t = 14$ s. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des mesures réalisées sur les N noyaux cellulaires analysés.

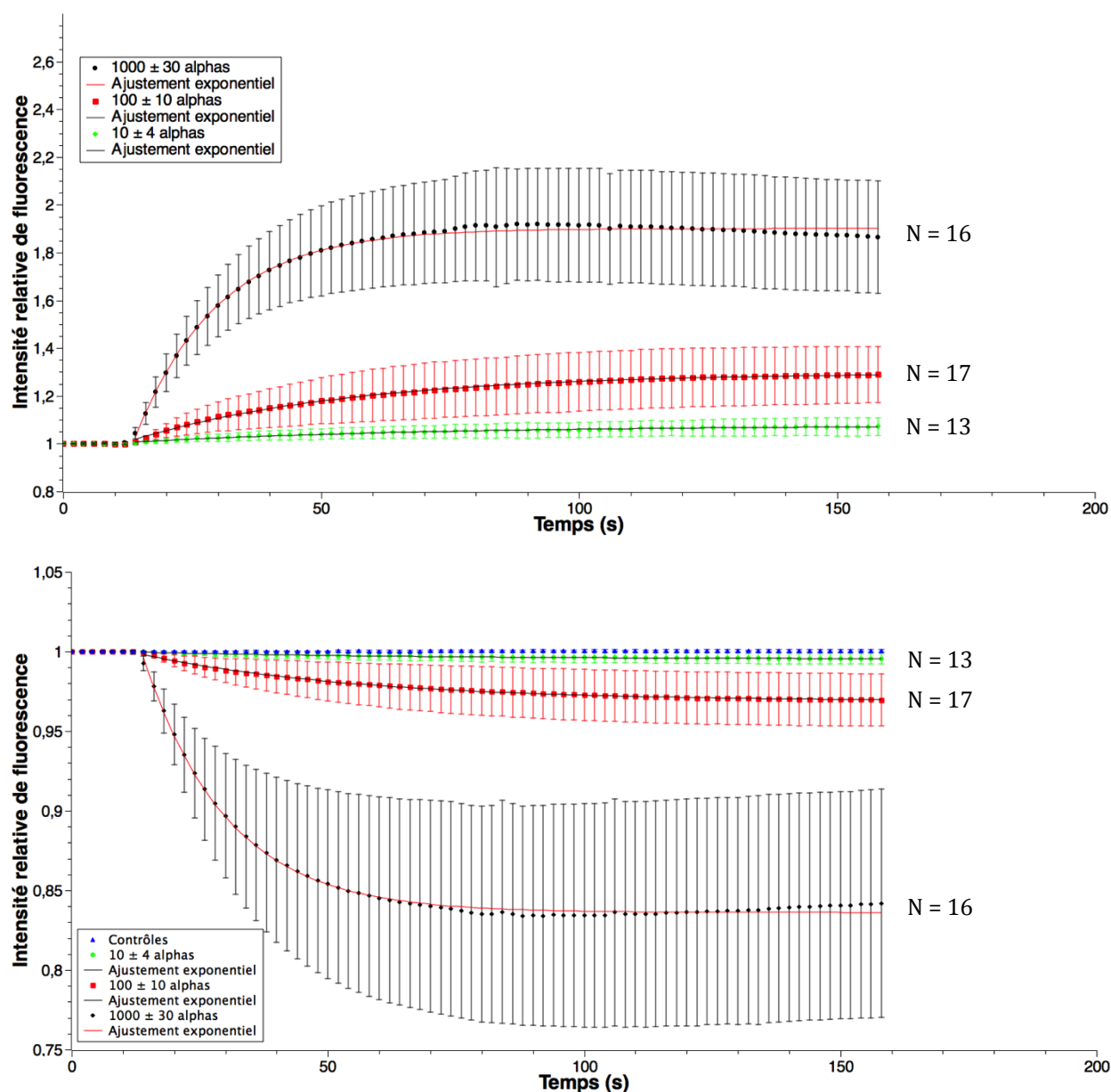


Figure 44 : Cinétique d'accumulation de la protéine XRCC1-GFP après irradiation par des particules α de 3 MeV. Évolution de la fluorescence de la protéine XRCC1-GFP, exprimée au sein de la zone irradiée (graphique du haut) et non-irradiée (graphique du bas) de noyaux de cellules HeLa irradiés par des particules α de 3 MeV. L'irradiation a lieu à $t = 10$ s et la relocalisation démarre à $t = 14$ s. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des mesures réalisées sur les N noyaux cellulaires analysés.

Plusieurs phénomènes sont visibles sur ces figures. Tout d'abord, la relocalisation de la protéine XRCC1-GFP est mesurable dans tous les cas, sauf après irradiation par 10 ± 4 protons. Cela confirme par traitement d'image et mesure la présence du seuil de réaction, ou de détection, observé sur la Figure 41. Dans le cas où la relocalisation de la protéine est mesurable, la variation de fluorescence commence systématiquement à $t = 14$ s, soit 4 secondes après irradiation, quel que soit le nombre ou le type de particules délivrées. Ceci signifierait que le recrutement de la protéine XRCC1-GFP devient visible au bout d'un laps de temps déterminé et ce indépendamment du nombre de dommages radio-induits.

Le recrutement exponentiel de XRCC1-GFP sur les sites endommagés est comparable avec ce qui est observé lors de mesures effectuées après irradiation de cellules exprimant XRCC1-GFP par des UV (Campalans *et al* 2013), ou par des ions lourds de haute énergie (Tobias *et al* 2010).

À première vue, pour un même type de particule, il semble y avoir une corrélation entre le nombre de particules délivrées et la cinétique de relocalisation. Les maxima des courbes dans les zones irradiées sont plus élevés lorsque le nombre de particules augmente, et semble également être atteint plus rapidement. Le même comportement est visible dans les zones non-irradiées avec les intensités minimales de chaque courbe. Afin de mesurer ces valeurs, les courbes ont été ajustées avec des fonctions exponentielles :

- pour l'augmentation de la fluorescence y dans les zones irradiées :

$$y = A_1 \cdot (1 - e^{-t/\tau_1}) + B_1 ;$$

- Pour la diminution de la fluorescence y dans les zones non-irradiées :

$$y = A_2 \cdot (e^{-t/\tau_2} - 1) + B_2.$$

Avec :

- A_i, B_i , constantes permettant l'ajustement des courbes, liées aux valeurs maximales et minimales des courbes ;
- τ_i , temps caractéristique de croissance/décroissance.

Afin de relier les valeurs mesurées à la quantité théorique de dommages infligés, les résultats obtenus sont organisés en fonction de la dose locale déposée dans chaque cas. Ces résultats sont présentés dans le chapitre E-2.3.2.

En comparant les zones irradiées et non-irradiées, nous pouvons voir une correspondance temporelle entre l'augmentation de l'intensité moyenne de fluorescence dans la zone irradiée et la diminution de l'intensité moyenne de fluorescence dans la zone non-irradiée. La fluorescence totale du noyau restant constante avec le temps, ce phénomène révèle un mécanisme de relocalisation de la protéine sur les sites ADN endommagés, plutôt qu'une synthèse *de novo* de XRCC1-GFP. Pour confirmer cela, nous avons cherché à établir un lien entre la quantité de fluorescence « gagnée » dans la zone irradiée (différence entre le niveau de départ et le niveau maximal) et celle « perdue » dans la zone non-irradiée (différence entre le niveau de départ et le niveau minimal). La Figure 45 représente ces deux quantités, appelées respectivement Δ_+ et Δ_- .

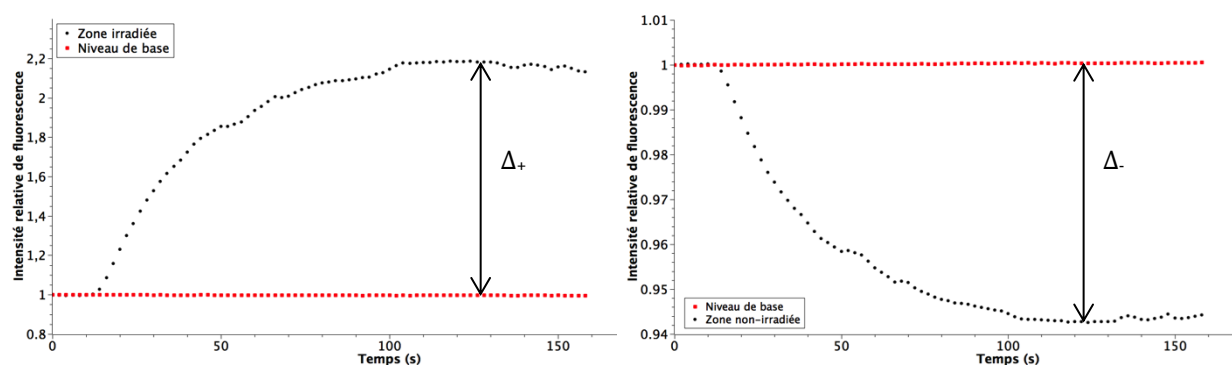


Figure 45 : Représentation schématique des valeurs Δ_+ et Δ_- , correspondant respectivement aux fluorescences gagnée et perdue dans les zones irradiées et non-irradiées.

Une valeur moyenne d'intensité de fluorescence correspond à la fluorescence totale de la zone, divisée par sa surface en pixels. Par conséquent, si la totalité de la fluorescence dans la zone non-irradiée se retrouve dans la zone irradiée, l'égalité $\Delta_+ S_i = \Delta_- S_{ni}$ doit être vraie, d'où :

$$\frac{\Delta_+}{\Delta_-} = \frac{S_{ni}}{S_i}$$

Les mesures effectuées sur des irradiations à différentes doses ont montré un écart relatif entre les deux rapports de l'ordre de 10%. Cet écart peut s'expliquer par la définition-même des régions d'intérêt, sélectionnées par seuillage manuel de l'intensité de fluorescence. Compte tenu du caractère subjectif de ce seuillage, les zones définies peuvent ne pas tout à fait correspondre aux zones irradiées et non-irradiées, ce qui induit un décalage dans les « gains » et « pertes » de fluorescence. Malgré tout, cet écart reste faible et le comportement décrit est systématique, quelle que soit la dose localement déposée. La fluorescence « disparaissant » de la zone non irradiée semble donc bien se relocaliser dans la zone endommagée.

2.3. Étude de la corrélation entre le dépôt de dose obtenu par modélisation numérique et les effets biologiques observés

L'utilisation des données de dosimétrie obtenues par modélisation numérique permet, dans un premier temps, de comparer la géométrie des zones de relocalisation des protéines après irradiation. Ces données permettent, dans un second temps, de classer les phénomènes biologiques observés en fonction de la quantité d'énergie absorbée, et de la dose locale correspondante.

2.3.1. Taille du dépôt d'énergie et spot de relocalisation de XRCC1

Pour approfondir le lien entre la géométrie du dépôt de dose et l'effet biologique, la taille du spot de relocalisation de XRCC1-GFP après irradiation a été comparé à celle du dépôt d'énergie. La Figure 46 montre une comparaison directe entre un noyau cellulaire exprimant la protéine XRCC1-GFP, après irradiation par 1000 ± 30 protons ou 100 ± 10 particules α de 3 MeV, ainsi que la représentation de la répartition spatiale du dépôt d'énergie, calculée par modélisation

numérique. Pouvoir mettre côte à côte modélisation et images obtenues expérimentalement, la résolution des deux types d'images doit être du même ordre. Nous avons dû pour cela dégrader la résolution de la modélisation pour s'adapter aux images de microscopie, dont la résolution est d'environ 400 nm.

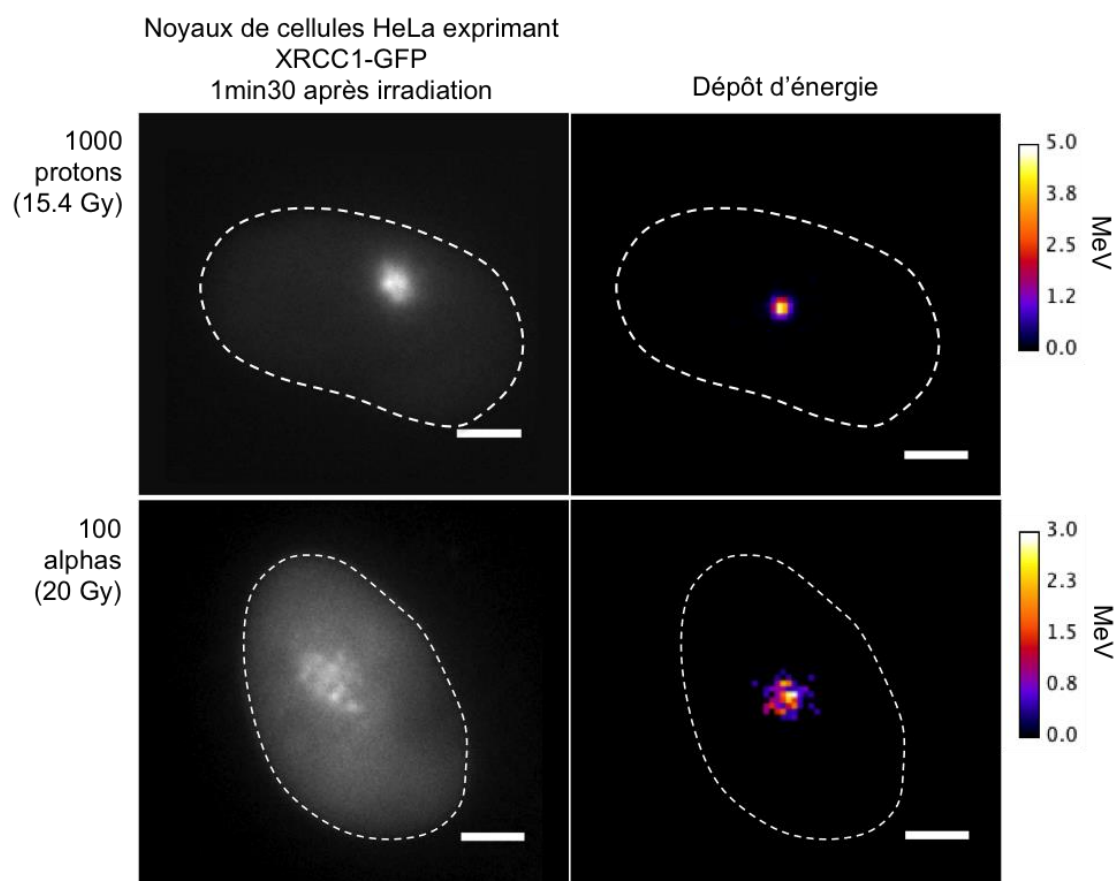


Figure 46 : Comparaison entre la relocalisation de la protéine XRCC1-GFP 1min30 après irradiation par des protons ou des particules α de 3 MeV avec une dose globale comparable, et la répartition spatiale du dépôt d'énergie correspondant. Échelle : 5 μ m.

D'après le chapitre E-1, le dépôt d'énergie modélisé au sein d'un noyau cellulaire présente une dispersion plus importante dans le cas de l'irradiation avec particules α , qu'avec des protons. La confirmation expérimentale de ce résultat est visible sur la Figure 46 avec spot de relocalisation de XRCC1-GFP plus dispersé après irradiation par des particules α .

Les tailles du spot de relocalisation de la protéine XRCC1-GFP et la taille du dépôt d'énergie modélisée, ont été comparées à partir de leur largeur à mi-hauteur.

Tableau 6 : Comparaison entre la taille du dépôt d'énergie calculée par modélisation numérique et la taille du spot de relocalisation de XRCC1-GFP après irradiation par 1000 ± 30 protons ou particules α de 3 MeV. La taille du spot a été mesurée au moment où il était le plus brillant.

Particule	Largeur à mi-hauteur du dépôt d'énergie (en μm)	Largeur à mi-hauteur du spot de relocalisation de XRCC1-GFP (en μm)
Protons	$0,83 \pm 0,70$	$2,57 \pm 0,31$
Particules α	$1,48 \pm 0,12$	$4,39 \pm 0,79$

Les résultats des calculs de largeur à mi-hauteur du dépôt d'énergie et des spots de relocalisation de XRCC1-GFP sont donnés dans le Tableau 6, montrant une différence systématique d'un facteur 3 entre la modélisation et l'expérience. Toutefois, le rapport entre les tailles de faisceau de particules α et de protons est similaire pour la modélisation et l'expérience. L'écart systématique peut s'expliquer par plusieurs phénomènes : tout d'abord, ce n'est pas le dépôt d'énergie qui est visualisé, mais la répartition d'une protéine fluorescente. Par conséquent, la protéine peut avoir un certain volume, ce qui peut augmenter la taille du spot de relocalisation. Une saturation de la fluorescence, dans certains cas, peut également entraîner un spot de relocalisation plus important. Cette différence de taille peut également provenir des dommages eux-mêmes. En effet, l'énergie du faisceau d'ions est déposée sur une zone définie, créant ainsi des clusters d'ionisation. Au sein de ces clusters, les dommages sur l'ADN peuvent être plus ou moins gros ou éloignés, ce qui peut entraîner une relocalisation de la protéine XRCC1-GFP sur une zone plus importante.

2.3.2. Corrélation dose locale déposée / effet biologique

Les données obtenues à partir des cinétiques de relocalisation présentées dans le chapitre E-2.2 doivent être visualisées en fonction de la densité de dommages infligés. Pour cela, dans le cas de la micro-irradiation, comme mentionné précédemment, c'est la dose locale absorbée dans la zone irradiée qui constitue une donnée pertinente. Les données ont donc été classées en fonction de cette dose locale.

Deux données principales ont été obtenues à partir des ajustements des courbes de cinétique de relocalisation de XRCC1 après irradiation : le temps caractéristique τ_i et la valeur maximale/minimale de fluorescence.

Le Tableau 7 montre l'évolution du temps caractéristique de relocalisation de la protéine XRCC1-GFP après irradiation par des protons et des particules α de 3 MeV en fonction de la dose locale déposée.

Tableau 7 : Temps caractéristiques obtenus à partir des ajustements des courbes de cinétique de relocalisation de XRCC1-GFP après irradiation par des protons ou des particules α de 3 MeV, en fonction de la dose locale déposée.

Dose locale (en Gy)	Nombre et type de particules	Zone irradiée	Zone non-irradiée
		Temps caractéristique (en s)	Temps caractéristique (en s)
5 \pm 2	10 \pm 4 protons	Pas de réaction	
20 \pm 8	10 \pm 4 particules α	61 \pm 5	58 \pm 14
47 \pm 5	100 \pm 10 protons	46 \pm 6	51 \pm 22
197 \pm 20	100 \pm 10 particules α	42 \pm 8	42 \pm 7
475 \pm 15	1 000 \pm 30 protons	29 \pm 8	29 \pm 11
1969 \pm 60	1 000 \pm 30 particules α	17 \pm 2	17 \pm 2

Trois résultats importants peuvent être extraits de ce tableau :

- Le seuil de réaction ou de visualisation de la protéine XRCC1-GFP peut être évalué. Ce seuil peut être grossièrement estimé entre des doses locales déposées de 5 et 20 Gy. Une étude à des doses intermédiaires permettrait une plus grande précision sur ce chiffre.
- Il y a un très bon accord entre les valeurs de temps caractéristiques mesurées dans les zones irradiée et non-irradiée. Ceci montre la symétrie des courbes et confirme que le phénomène observé est bien une relocalisation.
- Le temps de recrutement de la protéine XRCC1-GFP en fonction de la dose locale déposée peut être évalué. Nous avons vu dans le chapitre E-2.2 que la protéine réagit toujours 4 s après irradiation, et ce quelle que soit la dose locale déposée. Toutefois, si le temps de « latence » avant le début du recrutement de XRCC1-GFP ne varie pas, la durée de ce recrutement dépend de la dose locale déposée. Ainsi, lorsque la dose locale déposée augmente, le temps de recrutement de XRCC1-GFP diminue. Ce qui signifie qu'une fois que le recrutement a commencé, XRCC1-GFP est recrutée d'autant plus rapidement sur les sites ADN endommagés que la dose locale déposée est importante, et donc que la densité de dommages augmente. Afin de pouvoir caractériser plus précisément cette dépendance (dépendance linéaire, exponentielle, ...), il serait nécessaire de procéder à des irradiations à des doses locales intermédiaires. En effet, un saut important de dose locale absorbée a lieu entre 1000 protons et 1000 particules α .

Le Tableau 8 montre l'évolution des amplitudes maximales et minimales de relocalisation (en fonction de la zone d'intérêt considérée) de la protéine XRCC1-GFP après irradiation par des protons et des particules α de 3 MeV en fonction de la dose locale déposée.

Tableau 8 : Amplitudes maximales et minimales obtenues à partir des ajustements des courbes de cinétique de relocalisation de XRCC1-GFP après irradiation par des protons ou des particules α de 3 MeV, en fonction de la dose locale déposée.

Dose locale (en Gy)	Nombre et type de particules	Zone irradiée	Zone non-irradiée
		Amplitude maximale	Amplitude minimale
5 ± 2	10 ± 4 protons	Pas de réaction	
20 ± 8	10 ± 4 particules α	$1,07 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,01$
47 ± 5	100 ± 10 protons	$1,29 \pm 0,13$	$0,99 \pm 0,01$
197 ± 20	100 ± 10 particules α	$1,29 \pm 0,10$	$0,97 \pm 0,01$
475 ± 15	$1\,000 \pm 30$ protons	$2,19 \pm 0,49$	$0,94 \pm 0,04$
1969 ± 60	$1\,000 \pm 30$ particules α	$1,90 \pm 0,24$	$0,84 \pm 0,08$

Deux tendances se dégagent de ce tableau concernant une dépendance de l'intensité de la relocalisation en fonction de la dose locale déposée. Les amplitudes moyennes maximale dans la zone irradiée et minimale dans la zone non-irradiée semblent respectivement augmenter et diminuer lorsque la dose locale déposée augmente. Cela indiquerait une quantité de fluorescence relocalisée plus importante, et donc un nombre de dommages plus important. Toutefois l'incertitude importante associée à ces mesures empêche de tirer des conclusions plus poussées sur ce point. Plusieurs points peuvent expliquer ces incertitudes, au-delà de la simple variabilité biologique. Tout d'abord, les cellules n'étaient transfectées que de manière transitoire, ce qui a induit une certaine variabilité sur l'intensité de fluorescence de départ des noyaux. Par conséquent, le rapport protéine endogène / protéine fluorescente est également variable, ce qui peut affecter les mesures de quantité de fluorescence, alors que la variation temporelle de cette fluorescence après irradiation reste inchangée.

3. Visualisation en temps réel de la formation de dommages ADN indirects radio-induits à l'échelle cellulaire

Au cours de ce travail de thèse, j'ai également été amené à appliquer la méthodologie développée avec XRCC1 à d'autres types de marqueurs des dommages ADN radio-induits. C'est le cas notamment de la protéine OGG1, impliquée dans l'excision de la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), forme oxydée de la guanine. Ce type de marqueur peut s'avérer, en effet, très intéressant pour mieux comprendre l'impact des dommages ADN indirects, provoqués par les espèces radicalaires issues de la radiolyse de la molécule d'eau.

3.1. Génération et visualisation en temps réel de dommages ADN indirects suite à l'irradiation par microfaisceau d'ions

Les rayonnements ionisants interagissent avec la molécule d'ADN de manière directe, via la création de cassures simple- ou double-brin. Ces rayonnements interagissent également de manière indirecte, via la création d'espèces réactives oxygénées. Ces espèces réactives agissent sur la molécule d'ADN en provoquant un nombre important de lésions, comme l'oxydation de bases, la création de sites abasiques, et des cassures. Parmi les bases oxydées, 8-oxoG est un produit majeur (Campalans *et al* 2007, Amouroux *et al* 2010). Dans le cadre de l'étude des mécanismes de réparation de ces dommages, nous avons tout d'abord cherché à vérifier notre capacité à induire et à visualiser des dommages indirects sur des échantillons biologiques vivants en irradiant des noyaux de cellules HeLa.

Le mécanisme principal de réparation des bases oxydées est la réparation par excision de bases. Ce processus nécessite un type de protéine appelé ADN-glycosylase pour être initié. Dans le cas de la base oxydée 8-oxoG, la ADN-glycosylase impliquée est la protéine OGG1. Suite à l'irradiation en UVA de cellules humaines, une relocalisation de cette protéine a été montrée (Lan *et al* 2004, Campalans *et al* 2007). Toutefois, cette protéine n'a jamais été étudiée dans le cadre de micro-irradiations par des particules chargées. Le défi ici est de procéder à l'irradiation de noyaux de cellules HeLa exprimant la protéine OGG1-GFP avec des protons et des particules α de 3 MeV et de visualiser par vidéomicroscopie la relocalisation d'OGG1-GFP sur les sites endommagés après irradiation.

La Figure 47 et la Figure 48 montrent l'induction de la relocalisation d'OGG1-GFP après irradiation respectivement par des protons et des particules α de 3 MeV. L'irradiation a lieu à $t = 10$ s.

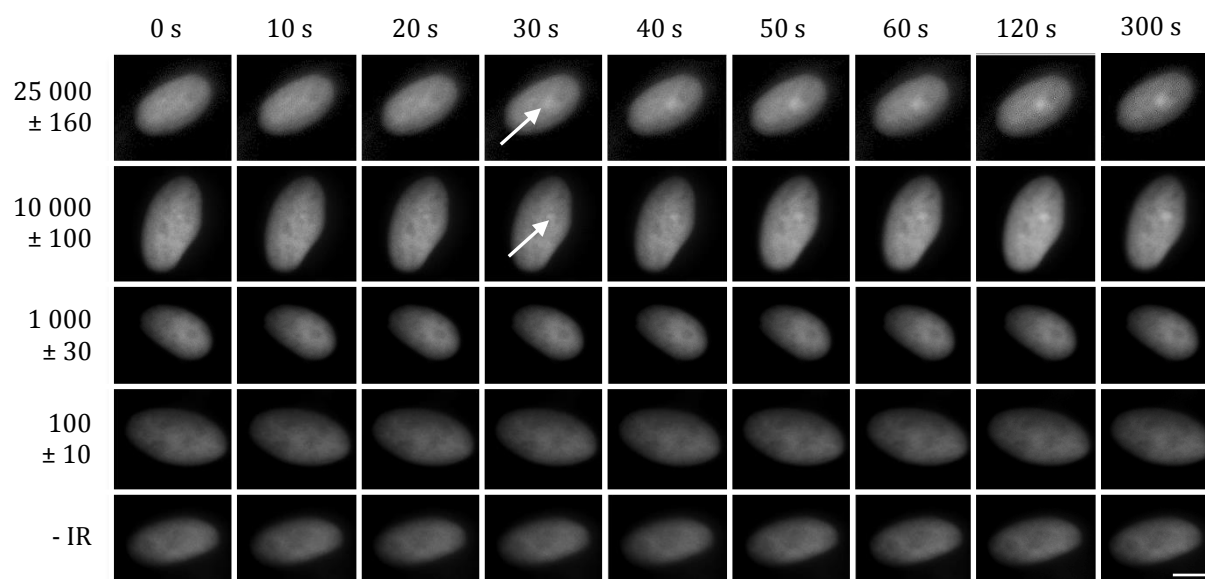


Figure 47 : Induction de la relocalisation d'OGG1 après micro-irradiation par des protons de 3 MeV. Le recrutement de la protéine OGG1-GFP est visualisé par vidéomicroscopie après irradiation ciblée des noyaux avec un nombre défini de protons de 3 MeV. La protéine s'accumule au niveau des sites ADN endommagés quelques secondes après irradiation. La présence d'un seuil de réaction ou de détection, situé en dessous de 10 000 protons, et en deçà duquel aucune relocalisation n'est visible, est à noter. L'irradiation a lieu au temps $t = 10$ s. Échelle : 10 μ m

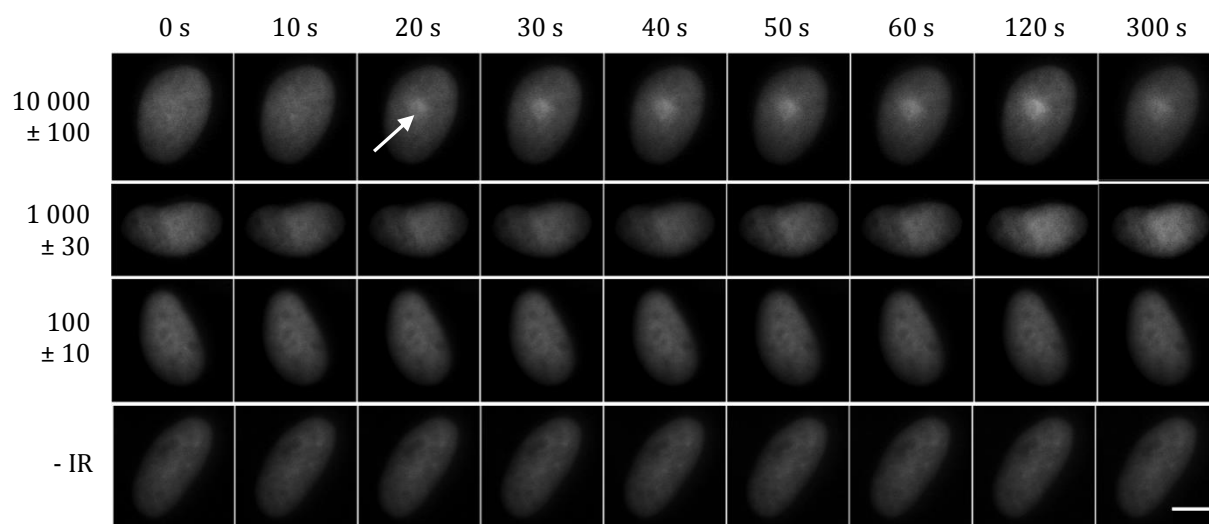


Figure 48 : Induction de la relocalisation d'OGG1 après micro-irradiation par des particules α de 3 MeV. Le recrutement de la protéine OGG1-GFP est visualisé par vidéomicroscopie après irradiation ciblée des noyaux avec un nombre défini de particules α de 3 MeV. La protéine s'accumule au niveau des sites ADN endommagés quelques secondes après irradiation. La présence d'un seuil de réaction ou de détection, situé en dessous de 10 000 particules α , et en deçà duquel aucune relocalisation n'est détectable, est à noter. L'irradiation a lieu au temps $t = 10$ s. Échelle : 10 μ m

Ces figures montrent la possibilité de générer des dommages ADN indirects par micro-irradiation ciblée de noyaux cellulaires par faisceau d'ions, et de visualiser en ligne la relocalisation de la protéine OGG1-GFP dans les secondes qui suivent cette irradiation. Sur ces figures, nous pouvons voir qu'aucune réaction d'OGG1-GFP n'est visible après irradiation avec un nombre de particules inférieur à 10 000 (que ce soit pour les protons et les particules alpha). Cela montre l'existence d'un seuil en dose en deçà duquel la relocalisation d'OGG1 n'est pas me-

surable avec cette méthode. Cela peut être dû au fait que l'énergie déposée est trop faible pour générer un nombre suffisant de dommages indirects, ou alors à cause d'une limite de sensibilité de notre système.

3.2. Étude de la cinétique de relocalisation de la protéine OGG1

Afin d'extraire des données numériques sur la cinétique de recrutement de la protéine OGG1-GFP après irradiation, les images obtenues sont traitées selon la méthode décrite dans le chapitre B-4.1. L'évolution avec le temps de la fluorescence est donc mesurée au sein de la zone irradiée des noyaux cellulaires, de la même manière qu'avec XRCC1-GFP.

Lorsqu'elle réagit, OGG1-GFP se relocalise de manière exponentielle, comme XRCC1-GFP. Afin de caractériser cette cinétique, les courbes ont été ajustées avec le même type de fonction exponentielle :

$$y = A \left(1 - e^{-t/\tau} \right) + B$$

Il est alors possible de mesurer les valeurs maximales des différentes courbes, ainsi que le temps caractéristique de croissance τ . Les résultats obtenus sont ramenés à la dose locale déposée dans chaque cas et sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Temps caractéristiques obtenus à partir des ajustements des courbes de cinétique de relocalisation d'OGG1-GFP après irradiation par des protons ou des particules α de 3 MeV, en fonction de la dose locale déposée.

Dose locale (en Gy)	Nombre et type de particules	Amplitude maximale	Temps caractéristique (en s)
5 ± 2	10 ± 4 protons	Pas de réaction	
20 ± 8	10 ± 4 particules α	Pas de réaction	
47 ± 5	100 ± 10 protons	Pas de réaction	
197 ± 20	100 ± 10 particules α	Pas de réaction	
475 ± 15	1 000 ± 30 protons	Pas de réaction	
1 969 ± 60	1 000 ± 30 particules α	Pas de réaction	
4 753 ± 47	10 000 ± 100 protons	1,06 ± 0,01	26 ± 1
11 874 ± 78	25 000 ± 160 protons	1,13 ± 0,01	20 ± 2
19648 ± 197	10 000 ± 100 particules α	1,13 ± 0,02	16 ± 1

Deux résultats importants peuvent être extraits de ce tableau.

- Il est possible d'évaluer une valeur supérieure pour le seuil de réaction, ou de détection. Ce seuil est situé en dessous d'une dose locale déposée de 4 753 Gy.
- Le temps de recrutement de la protéine OGG1-GFP peut être évalué en fonction de la dose locale déposée. Une dépendance de ce temps caractéristique avec la dose locale dé-

posée est clairement visible ici : la protéine réagirait plus rapidement lorsque la dose locale déposée, et donc la densité de dommages créés, augmente.

Comme dans le cas de l'étude des dommages ADN directs via la protéine XRCC1, l'amplitude maximale des courbes montre une très légère tendance à augmenter avec la dose locale déposée, mais ce phénomène reste difficile à mesurer. En effet, pour les mêmes raisons que précédemment, une certaine variabilité d'intensité de fluorescence entre les noyaux rendent difficile les calculs sur la quantité de fluorescence.

Il est important de noter qu'à cause de la relocalisation faible d'OGG1-GFP sur les sites ADN endommagés, les mesures de fluorescence se sont avérées plus difficiles que pour XRCC1-GFP. Des fluctuations importantes, notamment dans la mise au point de l'image, ont entraîné un certain nombre d'artefacts qui ont dégradé la qualité des mesures. C'est un point d'amélioration pour de prochaines mesures.

3.3. Relocalisation de OGG1 et réparation des dommages

Les travaux de Zielinska *et al* ont mis en évidence la réparation des dommages ADN indirects par la diminution de la fluorescence au niveaux de sites d'accumulation de OGG1-GFP après irradiation par laser UVA (Zielinska *et al* 2011). Afin de visualiser ce phénomène, avec des ions nous avons utilisé la vidéomicroscopie, avec un temps d'acquisition de 30 minutes, après irradiation par des particules α de 3 MeV. La Figure 49 montre les résultats de ces mesures.

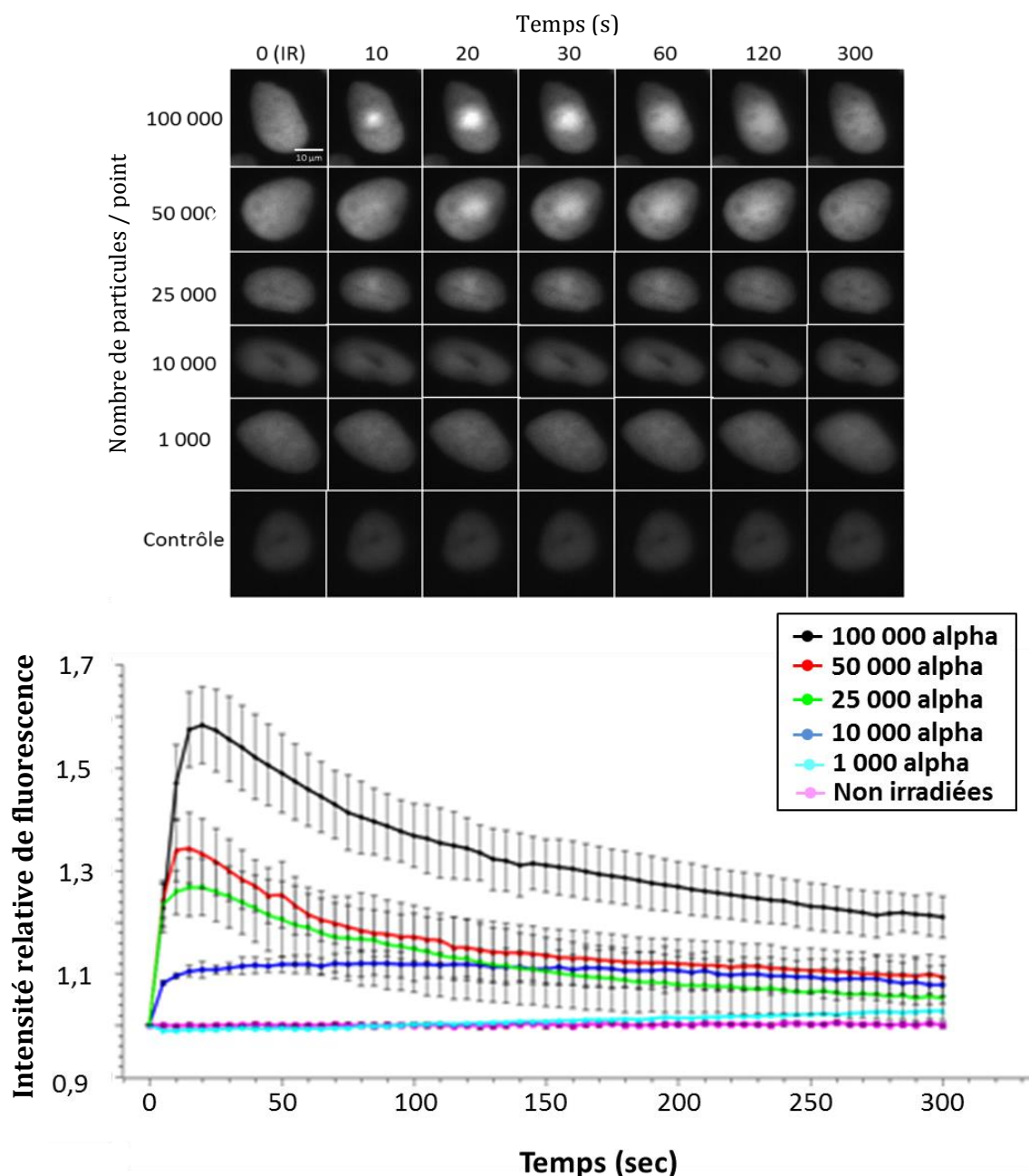


Figure 49 : Induction dose-dépendante de la relocalisation d'OGG1. Le recrutement de la protéine OGG1-GFP a été visualisé par vidéomicroscopie au cours d'irradiation de noyaux cellulaires avec des particules α de 3 MeV. L'irradiation a lieu au temps $t = 0$ s. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des mesures réalisées sur les noyaux cellulaires analysés. Échelle : 10 μ m

Cette figure montre, en plus de l'effet de seuil mentionné précédemment, une diminution de la fluorescence au sein de la zone irradiée. Cela correspondrait à la réparation des dommages ADN générés. Cette diminution de fluorescence commence environ 30 s après irradiation, et n'est visible qu'à partir de l'irradiation avec $25\,000 \pm 160$ particules α , ce qui correspond à une très forte dose locale déposée (environ 38 000 Gy).

F – IRRADIATION D'UN ORGANISME
MULTICELLULAIRE : EMBRYONS PRÉCOCES DE
CAENORHABDITIS ELEGANS

Afin d'étudier les effets des rayonnements ionisants chez un organisme multicellulaire, nous avons procédé à l'irradiation ciblée d'embryons précoces de *C. elegans*. À ce stade, ils sont constitués de deux cellules, nommées AB et P1, orientées selon un axe antéro-postérieur. Ces cellules entrent rapidement en division. Ainsi, il ne faut que 20 minutes pour passer du stade 2-cellules au stade 4-cellules.

Les travaux présentés dans ce chapitre portent sur le développement de la méthode pour irradier sélectivement un noyau d'un embryon précoce. Le défi technique est de procéder à l'irradiation ciblée d'un compartiment subcellulaire spécifique au sein d'un organisme en division, et donc en mouvement, puis de suivre en temps réel le développement de cet organisme après l'irradiation. Nous avons donc mis en place les procédures afin de visualiser les embryons, de choisir le moment opportun pour procéder à l'irradiation, et de suivre la division cellulaire.

Dans cette partie, nous présenterons dans un premier temps l'étude dosimétrique réalisée par modélisation numérique pour caractériser l'irradiation des embryons de *C. elegans*, puis les premiers résultats obtenus suite à ces irradiations sur différentes lignées de nématodes.

1. Modélisation de l'irradiation par faisceau d'ions d'un embryon précoce de *C. elegans*

La modélisation de l'irradiation d'embryons précoces de *C. elegans* a été réalisée afin de caractériser plusieurs paramètres, notamment le parcours des particules au sein de l'échantillon, la taille du faisceau d'ions à son entrée dans l'embryon, et la dose absorbée dans les différentes structures de l'embryon. L'outil de modélisation Monte-Carlo Geant4 a été utilisé avec la méthode décrite dans le chapitre C-2.

La Figure 50 montre une représentation schématique de l'irradiation du noyau de la cellule AB d'un embryon par un faisceau de protons de 3 MeV.

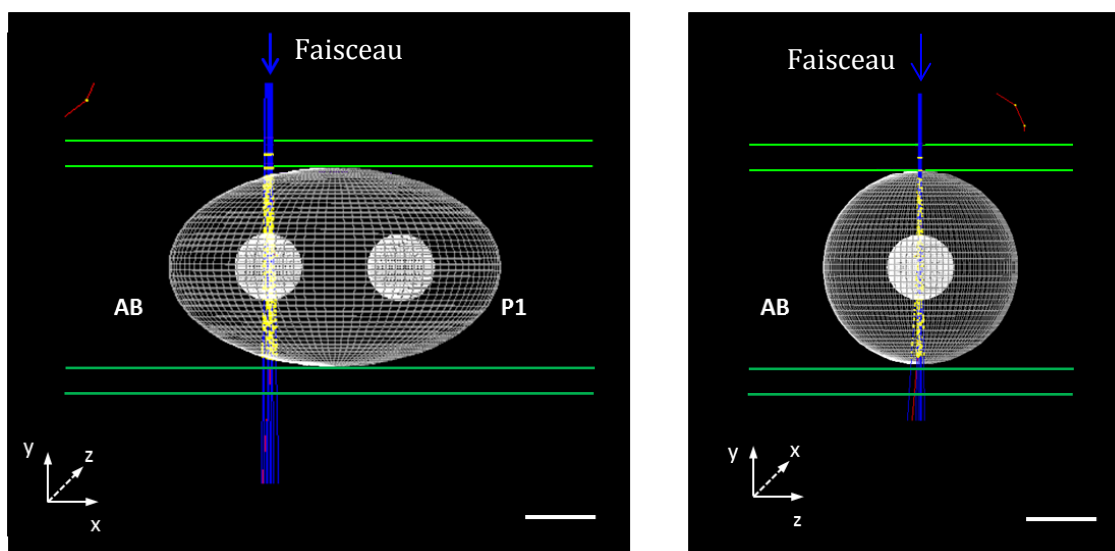


Figure 50 : Modélisation du dépôt d'énergie de protons de 3 MeV au sein d'un embryon précoce de *C. elegans* grâce à l'outil de simulation Geant4. L'embryon est modélisé par un ellipsoïde de 50 μm de grand axe pour 30 μm de petit axe. Les noyaux sont représentés par deux sphères de 10 μm de diamètre. La présence de deux films de polypropylène de 4 μm d'épaisseur au cours des irradiations est matérialisée par des lignes vertes. Le noyau de la cellule AB a été irradié avec 10 protons de 3 MeV. Le parcours des particules est représenté par les lignes bleues et l'interaction des particules avec la matière est marquée par des points jaunes. Deux vues du même embryon sont ici représentées. Échelle : 10 μm

Cette figure montre que les protons incidents ont un parcours dans la matière suffisant pour traverser les embryons et atteindre leur noyau. Par ailleurs, la modélisation confirme que les protons incidents peuvent être détectés en aval du puits grâce à la photodiode PIN, grâce à la configuration du puits de culture, où les embryons sont simplement maintenus entre deux membranes de polypropylène de 4 μm d'épaisseur.

Nous cherchons à caractériser les effets des rayonnements ionisants sur le noyau des embryons. Afin d'interpréter les effets biologiques observés, il est donc nécessaire de déterminer la dose absorbée au sein du noyau irradié. Grâce à la modélisation, il est possible de calculer l'énergie déposée dans les différentes structures de l'embryon (noyaux et embryon total), et, à partir de là, les doses absorbées correspondantes. Ces résultats sont donnés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Modélisation de l'énergie et de la dose déposées dans le noyau AB et dans la totalité d'un embryon précoce de *C. elegans* lors d'une irradiation ciblée par faisceau de protons de 3 MeV.

Nombre de particules incidentes	Énergie absorbée dans le noyau (en MeV)	Énergie absorbée dans l'embryon (en MeV)	Dose absorbée dans le noyau (en Gy)	Dose absorbée dans l'embryon (en Gy)
1 proton	0,127	0,198	0,039	0,002
10 protons	1,25	2,15	0,382	0,023
100 protons	11,89	21,51	3,64	0,227
1 000 protons	120,35	215,24	36,77	2,28
10 000 protons	1206,58	2153,88	368,70	22,83

Il est important de noter que l'irradiation est limitée au noyau ciblé, c'est à dire que si le noyau de la cellule AB est irradié, aucun dépôt d'énergie n'a lieu dans le noyau de la cellule P. Les embryons ont été irradiés avec 1 000 ou 10 000 protons de 3 MeV, ce qui se traduit par une dose absorbée dans le noyau de 36,77 Gy et 368,70 Gy, respectivement.

Par modélisation, il est également possible de déterminer la position des particules lors de leur entrée dans l'embryon et aussi de définir la taille du faisceau à l'entrée dans l'échantillon, qui peut être comparée aux observables biologiques obtenues par l'expérience. La Figure 51 représente la distribution spatiale des protons lors de leur entrée dans l'embryon de *C. elegans*.

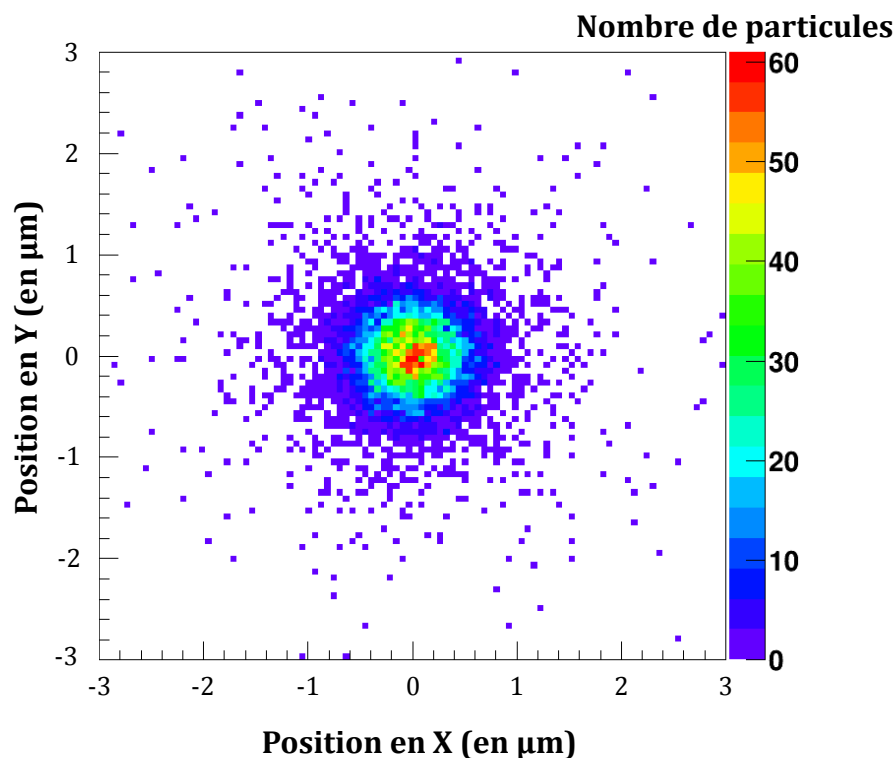


Figure 51 : Modélisation numérique de la distribution spatiale des particules délivrées au sein d'un embryon précoce de *C. elegans* lors d'une irradiation par faisceau de protons de 3 MeV. Le noyau de la cellule AB a été irradié avec 10 000 protons de 3 MeV.

À partir de ces données, la largeur à mi-hauteur du faisceau à l'entrée dans l'embryon s'avère être de 1,50 µm et 99% des particules sont situées dans un cercle de 3,82 µm de diamètre. Un noyau pouvant être approximé par une sphère de 10 µm de diamètre, ce résultat permet de vérifier que toutes les particules incidentes sont déposées au sein du noyau ciblé.

2. Visualisation en temps réel des conséquences de l'irradiation par faisceau d'ions à l'échelle multicellulaire chez le nématode *C. elegans*

2.1. Suivi des divisions cellulaires chez un embryon précoce de *C. elegans*

Pour procéder à l'irradiation des embryons, il est nécessaire de définir les conditions optimales de visualisation des premiers stades de division cellulaire chez un embryon précoce de *C. elegans*. Pour cela, nous avons utilisé des embryons appartenant à la lignée transgénique MG152. Ces embryons expriment l'histone H2B fusionnée à la GFP, permettant de visualiser la chromatine présente dans les noyaux cellulaires et ses différents stades de condensation au cours de la mitose (Strome *et al* 2001, Kaitna *et al* 2000). L'utilisation de la vidéomicroscopie permet ainsi de suivre les divisions cellulaires directement en ligne.

La Figure 52 présente une sélection d'images représentant les étapes-clés de la division des cellules AB et P d'un embryon précoce de *C. elegans*.

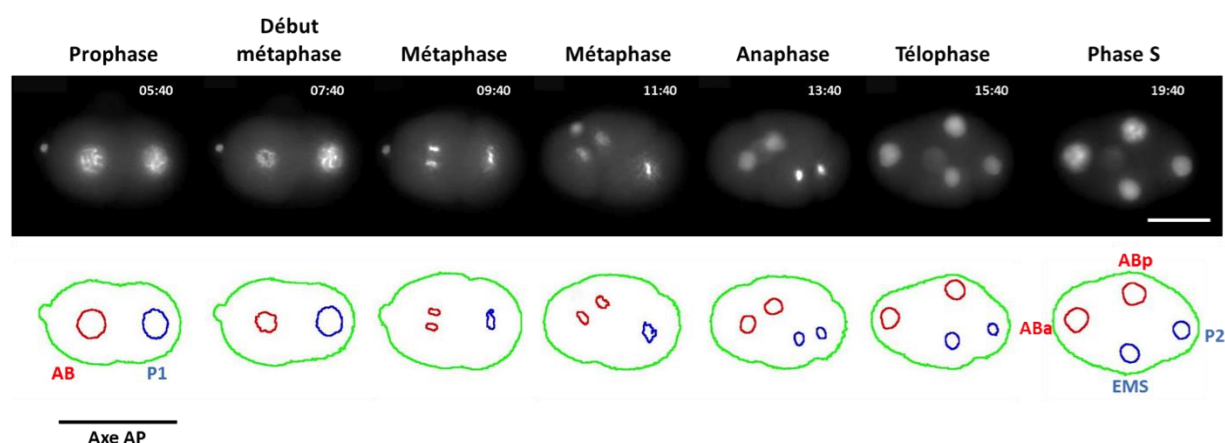


Figure 52 : Visualisation des différents stades de la condensation chromosomique au cours de la division cellulaire embryonnaire. Les embryons de la lignée MG152 ont été visualisés par vidéomicroscopie. Les noyaux des cellules embryonnaires ainsi qu'un globule polaire sont visibles en fluorescence. Grâce à cette lignée, la condensation et la séparation des chromosomes au cours des différentes phases de mitose sont observables. L'embryon est orienté selon son axe antéro-postérieur. Les lignées cellulaires AB et P1 sont respectivement représentées en rouge et bleu en dessous de chaque image de microscopie. Échelle : 20 µm.

Sur cette figure, les différentes étapes de la condensation chromatinienne sont visibles. Les chromosomes commencent à être visibles en prophase. Lors de la métaphase, les membranes nucléaires se rompent, et les chromosomes s'alignent sur un même plan de division. Ils se séparent ensuite vers les deux pôles opposés de la cellule-mère. En anaphase, la séparation des chromosomes est achevée et les membranes nucléaires se reforment en télophase. L'embryon est alors au stade 4-cellules. Les noyaux-fils du noyau AB sont appelés ABa et ABp. Les noyaux-fils de la cellule P1 sont appelés P2 et EMS. Leur position par rapport aux axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont toujours les mêmes et sont indiquées sur la figure.

2.2. Micro-irradiation d'embryons MG152

Nous avons utilisé la lignée MG152 afin de mettre au point les protocoles de micro-irradiation ciblée et de suivi d'un noyau cellulaire spécifique. Comme expliqué précédemment, la difficulté pour procéder à ce type d'irradiation repose, dans ce cas, sur le fait que l'organisme ciblé est en mouvement quasi-constant, puisque les divisions cellulaires successives sont très rapides dans un embryon précoce. Il faut donc réussir à cibler le noyau lorsqu'il est au stade voulu du cycle cellulaire, et à l'irradier très rapidement.

Un atout essentiel de notre système est d'offrir la possibilité de procéder, de manière parallèle et indépendante, à la visualisation en temps réel via la vidéomicroscopie en ligne, au ciblage en direct, et à la micro-irradiation en dose contrôlée. Ainsi, nous avons pu procéder à la micro-irradiation ciblée de noyaux AB d'embryons précoces de *C. elegans* de la lignée MG152 avec 10 000 protons de 3 MeV juste avant leur entrée en division. La visualisation de ces embryons avant, et après irradiation a été réalisée par vidéomicroscopie en ligne.

La Figure 53 montre une sélection d'images à différents stades de la division cellulaire après irradiation par faisceau de protons.

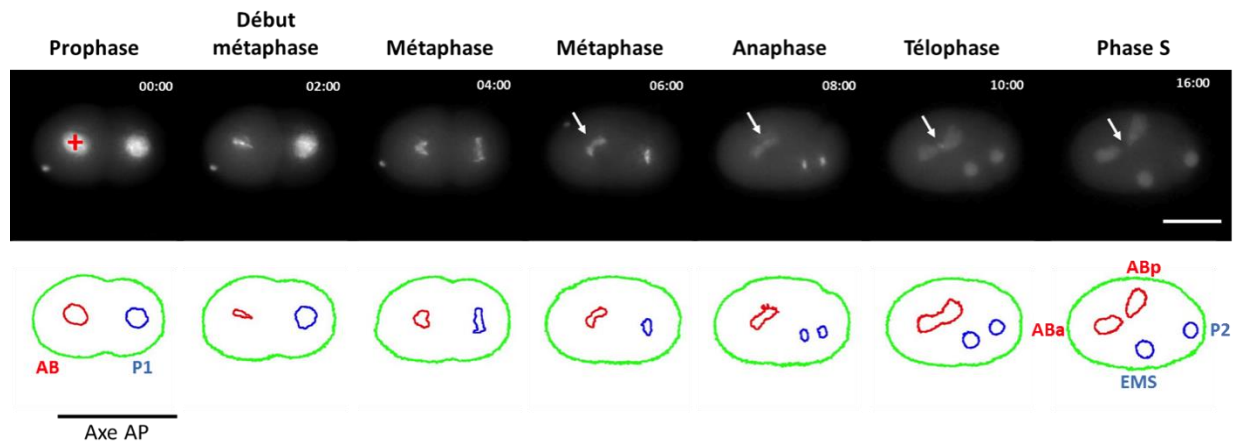


Figure 53 : Non-disjonction chromosomique radio-induite. Le noyau de la cellule AB d'un embryon MG152 est irradié de manière ciblée avant son entrée en mitose (croix rouge). La formation d'un pont chromosomique entre les noyaux des cellules ABa et ABp est visible en métaphase et persiste lors des phases de mitose suivantes (flèche). L'embryon est orienté selon son axe antéro-postérieur. Les lignées cellulaires AB et P1 sont respectivement représentées en rouge et bleu. Échelle : 20 μ m.

Cette figure montre une anomalie lors de la division du noyau cellulaire AB après irradiation par 10 000 protons de 3 MeV. En effet, si les chromosomes s'alignent correctement sur leur plan de division au début de la métaphase, leur séparation ne s'effectue pas correctement, et ils semblent rester attachés les uns aux autres par des filaments de chromatine. Ce phénomène persiste au cours des étapes suivantes de la division. Les noyaux fils ABa et ABp gardent une forme anormale et semblent toujours liés par ce pont chromosomique. En ce qui concerne le noyau P1, qui n'a pas été irradié, aucune anomalie chromosomique n'est apparue au cours de la division.

Le pont chromosomique visible entre les noyaux ABa et ABp est donc une conséquence de l'irradiation du noyau AB avant son entrée en division.

2.3. Visualisation des dommages ADN radio-induits : Micro-irradiation d'embryons WS1433

Afin d'observer plus directement les dommages ADN radio-induits, nous avons utilisé la lignée transgénique WS1433, qui exprime la protéine de fusion HUS-1::GFP au sein des noyaux des cellules germinales et des embryons précoces. Il a en effet été montré qu'après l'induction de dommages ADN radio-induits au sein de cellules germinales de vers adultes, la protéine HUS-1::GFP s'accumule au niveau des sites ADN endommagés (Hofmann *et al* 2002).

Chez un embryon précoce non-irradié (cf. Figure 54), la protéine HUS-1::GFP s'exprime de manière homogène au sein des noyaux AB et P1. Lors de la division cellulaire, et plus particulièrement au cours de la métaphase, les membranes nucléaires se désagrègent et la protéine est alors diffusée au sein du cytoplasme des cellules embryonnaires. Lors de l'anaphase, et de la reformation des membranes nucléaires, la protéine s'accumule petit à petit dans les noyaux fils, et est à nouveau visible de manière homogène dans les noyaux à la fin de la mitose.

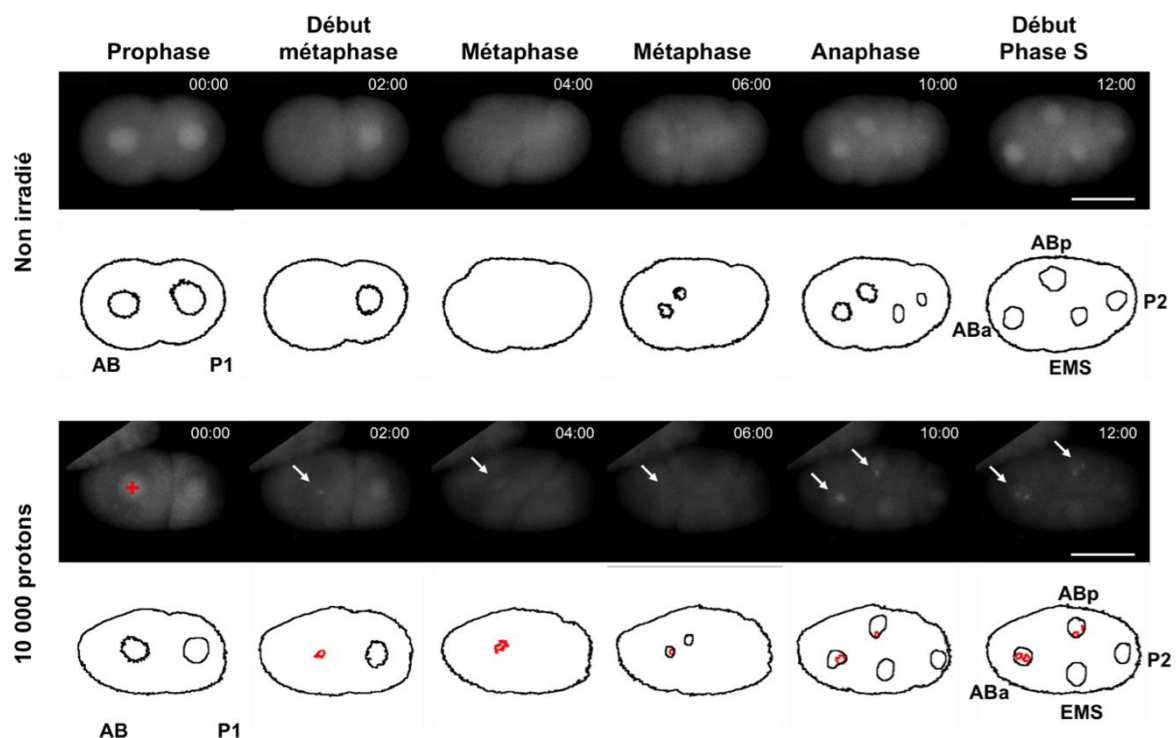


Figure 54 : Induction de dommages ADN localisés à l'échelle cellulaire. Les embryons WS1433 ont été visualisés par vidéomicroscopie. La protéine HUS-1::GFP est une protéine exprimée de manière homogène au sein des noyaux des cellules embryonnaires. Lorsque le noyau de la cellule AB est irradié de manière ciblée avec 10 000 protons avant l'entrée en mitose (croix rouge), la protéine HUS-1::GFP s'accumule au niveau des sites ADN endommagés (flèches et cercles rouges). L'accumulation de la protéine persiste tout au long de la division des cellules (flèches et cercles rouges) et est visible chez les noyaux ABa et ABp. Échelles : 20 μ m.

La protéine HUS-1::GFP permettant de visualiser le noyau des cellules embryonnaires, il est possible de procéder à leur irradiation ciblée. La Figure 54 montre les conséquences de l'irradiation du noyau AB d'un embryon précoce WS1433 avec 10 000 protons de 3 MeV avant son entrée en division. Quelques minutes après irradiation, des sites d'accumulation de la protéine HUS-1::GFP apparaissent au sein du noyau AB irradié. Ces sites d'accumulation persistent au cours de la division du noyau AB, et restent présents au sein des noyaux-fils ABa et ABp, où ils semblent même se dédoubler. En revanche, nous n'avons pas décelé d'accumulation anormale de la protéine HUS-1::GFP au sein du noyau P1 ou de ses noyaux-fils.

La formation des sites d'accumulation de HUS-1::GFP indique la présence de cassures ADN radio-induites au sein du noyau irradié. D'après les données obtenues par Hofmann *et al*, ces lésions ADN générées s'apparenteraient à des cassures ADN double brin (Hofmann *et al* 2002).

2.4.Irradiation en fonction du cycle cellulaire : Micro-irradiation d'embryons GZ264

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules embryonnaires se divisent rapidement au cours de l'embryogenèse du nématode *C. elegans*. Ainsi, nous pouvons assister aux différentes phases du cycle de division de toutes les cellules embryonnaires sur un temps relativement court, d'environ 20 minutes pour les cellules AB et P1. Afin de pouvoir irradier dans une phase précise du cycle, nous avons utilisé les nématodes de la lignée GZ264, qui expriment la protéine PCN-1 fusionnée à la GFP au sein des noyaux des cellules embryonnaires. La protéine PCN-1 est impliquée dans de multiples mécanismes cellulaires dont la réplication et la réparation de l'ADN mais également dans la progression du cycle cellulaire. La protéine GFP::PCN-1 a précédemment été utilisée comme un marqueur de la phase S au cours de la division des cellules embryonnaires (Kisieleska *et al* 2005, Sonnevile *et al* 2012). Ceci est confirmé par la comparaison entre des embryons des lignées MG152 et GZ264 (cf. Figure 55). La protéine GFP::PCN-1 est exprimée au sein des noyaux cellulaires, se diffuse dans le cytoplasme au début de la mitose, pour se relocaliser dans les noyaux-fils à la fin de la mitose. Sa disparition marque donc l'entrée en division des cellules embryonnaires.

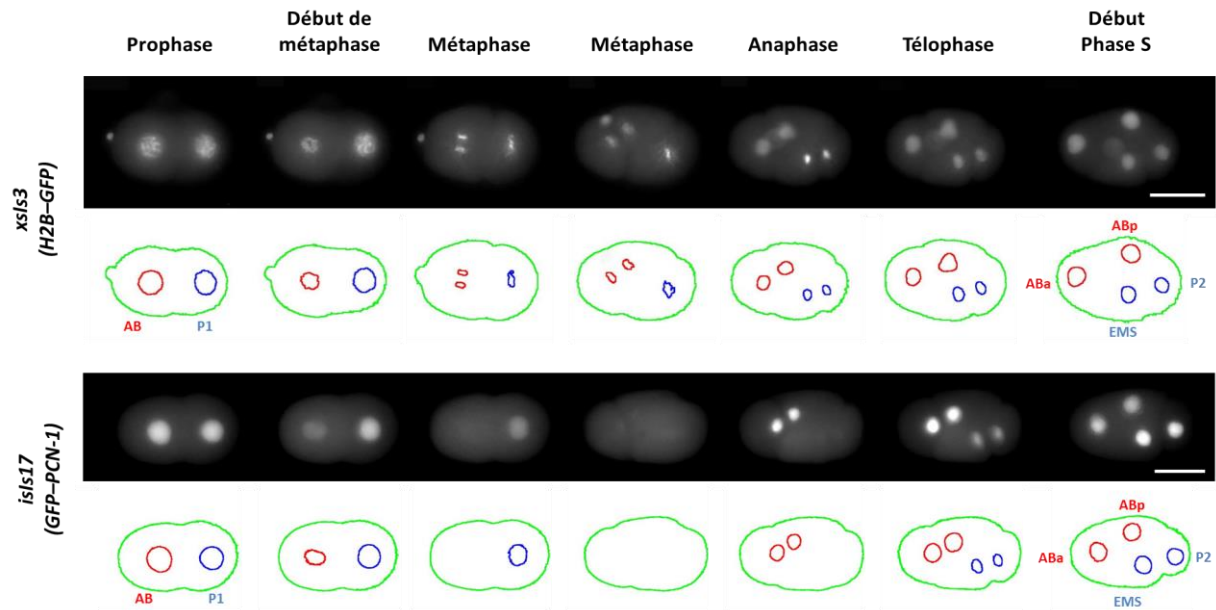


Figure 55 : Visualisation de la phase S chez un embryon précoce de *C. elegans*. En comparant le profil d'expression des embryons MG152 et GZ264, exprimant la protéine GFP::PCN-1, il apparaît que la protéine GFP::PCN-1 est accumulée au sein des noyaux des cellules AB et P1 en phase S et en début de prophase. L'expression de la protéine GFP::PCN-1 marque ainsi l'entrée en mitose des cellules embryonnaires. Les lignées cellulaires AB et P1 sont respectivement représentées en rouge et bleu. Échelles : 20 μ m

Cette lignée de *C. elegans* nous a permis de procéder à l'irradiation ciblée de noyaux d'embryons précoces en prophase. Ainsi, des noyaux de cellules AB d'embryons GZ264 ont été irradiés de manière ciblée avec 1 000 ou 10 000 protons de 3 MeV (cf. Figure 56), juste avant leur entrée en division, lorsque l'expression de la protéine GFP::PCN-1 est à son maximum, avec un positionnement au centre de la cellule.

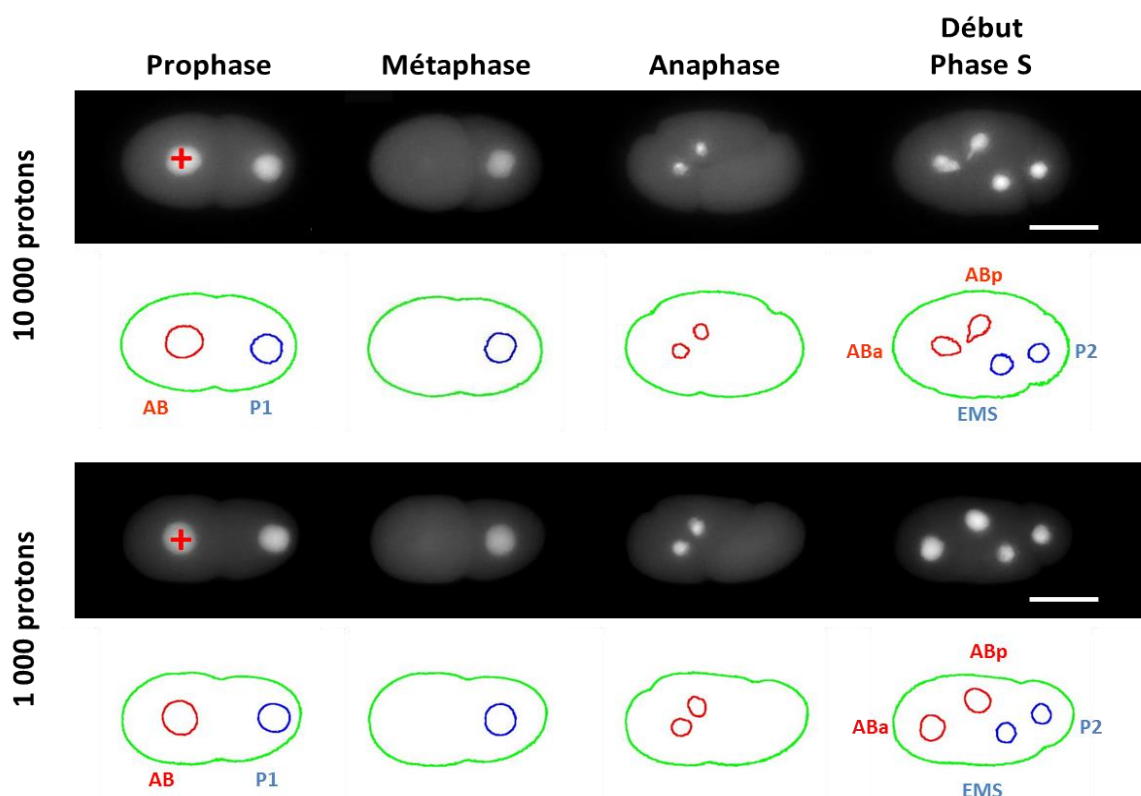


Figure 56 : Induction de dommages ADN en fonction du cycle cellulaire. Les embryons GZ264 exprimant la protéine GFP::PCN-1 ont été irradiés de manière ciblée avec des protons de 3 MeV. Pour chaque embryon, le noyau de la cellule AB a été irradié avec 10 000 ou 1 000 protons avant l'entrée en mitose de la cellule (croix rouge). La formation d'un pont chromosomique entre les noyaux des cellules ABa et ABp est visible en fin de mitose et persiste en début de phase S (flèches) lorsque le noyau AB est irradié avec 10 000 protons. L'irradiation du noyau AB avec 1 000 protons ne semble pas induire la formation d'anomalies chromosomiques. Les lignées cellulaires AB et P1 sont respectivement représentées en rouge et en bleu. Échelles: 20 μ m.

Après l'irradiation, les noyaux entrent en mitose, ce qui est visible par la disparition du signal GFP::PCN-1. En cours d'anaphase, la protéine s'accumule à nouveau au sein des noyaux-fils nouvellement formés. Lorsque le noyau AB est irradié avec 10 000 protons, les noyaux fils ABa et ABp ont une morphologie anormale et semblent être reliés l'un à l'autre par une excroissance nucléaire. Cette structure s'apparente fortement aux ponts chromosomiques radio-induits décrits précédemment avec la lignée MG152. Ce type d'anomalie n'a par contre pas été observé après irradiation du noyau AB avec 1 000 protons.

3. Étude de l'impact des rayonnements ionisants sur la division des cellules embryonnaires : Mesure du temps de division des cellules embryonnaires

La disparition du signal de la protéine GFP::PCN-1 définissant l'entrée en division des noyaux, il est possible de déterminer l'intervalle de temps entre la division des cellules pour mesurer une asynchronie entre elles. Afin d'étudier l'importance des anomalies chromosomiques montrées précédemment, et leur impact sur la division des cellules embryonnaires, nous avons mesuré,

grâce à la vidéomicroscopie, le temps de division des cellules AB, P1, ABa, ABp, EMS et P2 au sein d'embryons GZ264 jusqu'au stade 8-cellules (Figure 57).

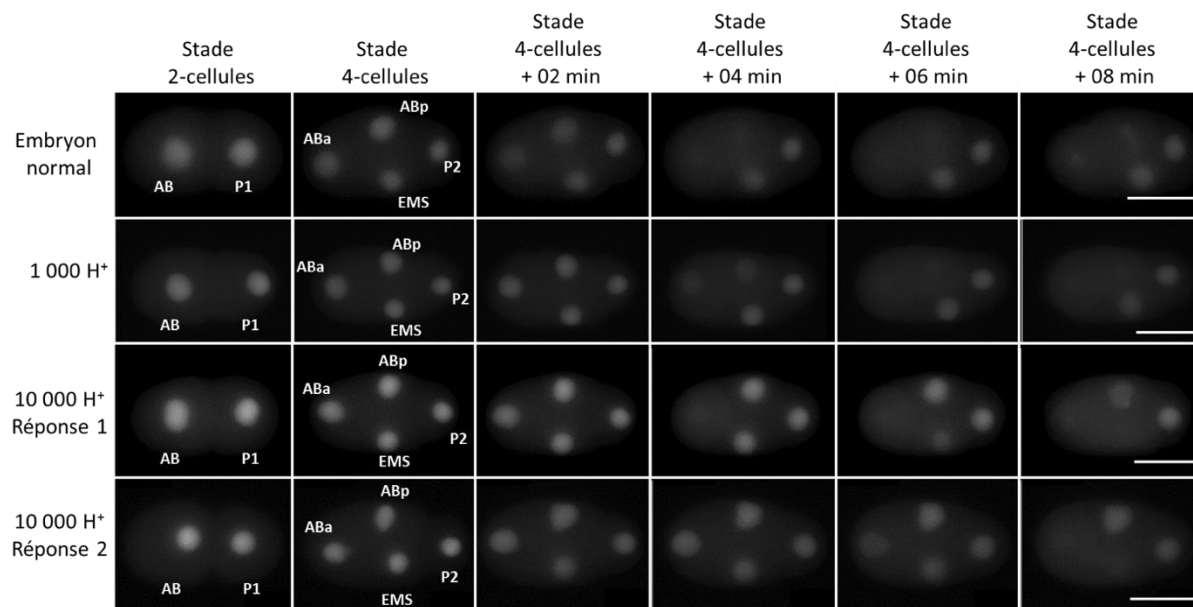


Figure 57 : Induction de la division asynchrone des cellules embryonnaires. Des embryons GZ264 ont été irradiés sélectivement et le temps d'entrée en division des cellules a été observé en vidéomicroscopie à épifluorescence. Pour chaque embryon irradié, 1 000 ou 10 000 protons de 3 MeV ont été délivrés au sein du noyau de la cellule AB. Lorsque la cellule AB est irradiée avec 10 000 protons, une asynchronie des divisions d'ABa et ABp apparaît. Échelles : 20 μ m

Au stade 4-cellules, dans le cas d'un embryon non irradié, les cellules ABa et ABp entrent en division simultanément, ce qui est visible par la disparition du marquage GFP::PCN-1 au sein des noyaux embryonnaires. L'entrée en division des cellules EMS et P2 a lieu quelques minutes après.

Dans le cas d'un embryon irradié au sein du noyau de la cellule AB par 1 000 protons de 3 MeV, la division cellulaire se déroule normalement. Aucune différence dans l'ordre ou la synchronisation des divisions n'est décelable.

Dans le cas d'une irradiation avec 10 000 protons, par contre, un décalage dans l'entrée en division des deux cellules ABa et ABp est visible. En effet, après irradiation, lorsque l'embryon est au stade 4-cellules, nous assistons dans un premier temps à l'entrée en division de la cellule ABa suivie, après quelques minutes (réponse 1) ou quelques secondes (réponse 2), par la cellule EMS. La cellule ABp entre en division après les cellules ABa et EMS, suivie par la cellule P2. Nous observons ici que l'entrée en division des cellules ABa et ABp est devenue asynchrone suite à l'irradiation ciblée du noyau de la cellule AB.

Afin de confirmer ces observations, et grâce au profil d'expression de la protéine GFP::PCN-1, nous avons mesuré le temps mis par une cellule embryonnaire pour entrer en division. Nous

avons ensuite calculé la différence de temps d'entrée en division entre les différentes cellules embryonnaires. Les résultats obtenus pour des embryons non-irradiés et irradiés par 1 000 ou par 10 000 protons sont comparés sur la Figure 58.

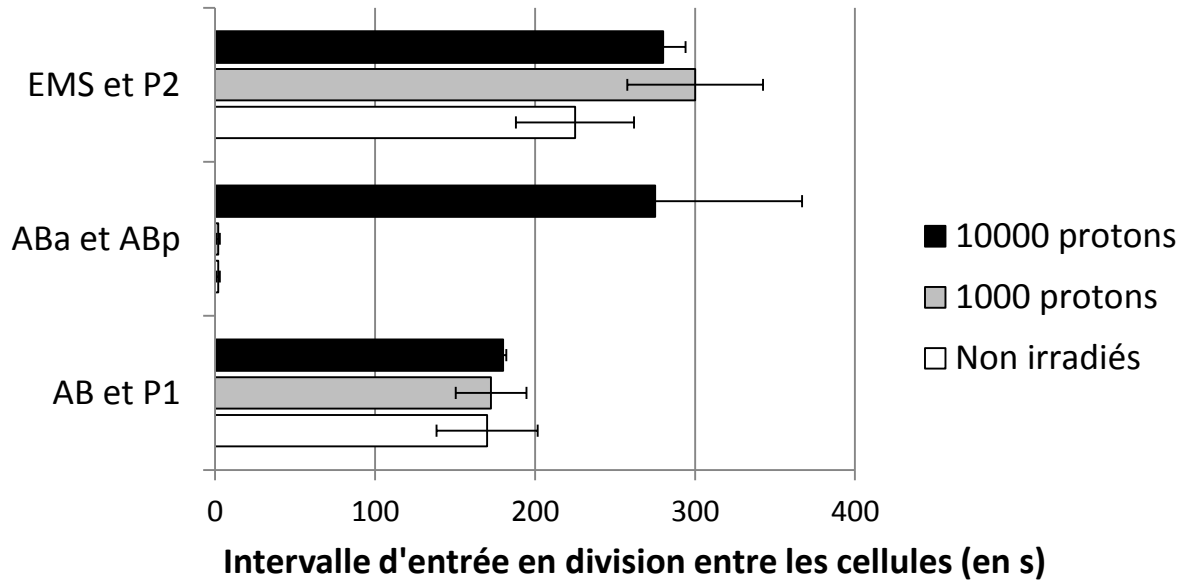


Figure 58 : Mesure de l'asynchronie de la division des cellules embryonnaires après irradiation. Des embryons GZ264 ont été sélectivement irradiés au sein du noyau des cellules AB par 1 000 ou 10 000 protons avant leur entrée en division. La différence de temps d'entrée en division entre les cellules AB et P1, ABa et ABp, EMS et P2 a été mesurée pour chacune des conditions.

Cette figure montre que l'irradiation par 1 000 protons de 3 MeV n'influence pas de manière significative l'entrée en division des cellules embryonnaires, qui gardent un intervalle de temps normal. L'irradiation par 10 000 protons, en revanche, induit une asynchronie notable dans la division des cellules ABa et ABp, qui ne se divisent alors plus simultanément.

4. Visualisation et irradiation d'embryons précoces de *C. elegans* en multi-fluorescence : la lignée SA250

Le dispositif de microscopie mis en place sur l'étage terminal de la ligne d'irradiation a été conçu pour réaliser l'acquisition rapide d'images en vidéomicroscopie, et en multi-fluorescence. Cela permet de visualiser alternativement les signaux issus de protéines couplées à des fluorochromes différents. Ainsi, plusieurs mécanismes peuvent être étudiés au sein d'un même échantillon.

Afin de mettre au point les protocoles d'imagerie et d'irradiation d'échantillons en multi-fluorescence, nous avons utilisé des embryons précoces de *C. elegans* appartenant à la lignée SA250. Les nématodes appartenant à cette lignée expriment l'histone H2B et la tubuline- γ associées à la protéine fluorescente rouge mCherry ainsi que la tubuline- β couplée à la GFP. En ob-

servant des embryons de la lignée SA250 en microscopie à fluorescence, les chromosomes sont visibles en rouge (mCherry::H2B), les microtubules en vert (GFP:: β -tubuline) et les centrosomes en jaune (co-localisation entre les protéines GFP:: β -tubuline et mCherry:: γ -tubuline) (Toya *et al* 2010).

La Figure 59 montre la visualisation par vidéomicroscopie en multi-fluorescence du passage d'un embryon SA250 du stade 2-cellules au stade 4-cellules. Sur cette figure, la condensation de la chromatine au cours des différentes étapes de la mitose peut être observée, ainsi que la formation et la dynamique des fuseaux mitotiques, qui assurent la séparation des chromosomes lors de la métaphase.

Afin de vérifier notre capacité à procéder à l'irradiation d'un compartiment spécifique d'un échantillon multicellulaire, tout en procédant à une acquisition d'images en multi-fluorescence, nous avons irradié de manière ciblée le noyau de la cellule AB d'un embryon précoce SA250 avec 10 000 protons de 3 MeV juste avant sa division. Le ciblage a été réalisé sur le signal de fluorescence correspondant au mCherry, qui marque l'histone H2B, et donc le noyau. La vidéomicroscopie a été conduite en parallèle de l'irradiation, pour permettre une irradiation au moment opportun. La Figure 60 montre une sélection d'images à différents stades de la division cellulaire après irradiation par faisceau de protons.

Comme dans le cas de l'irradiation d'embryons de la lignée MG152, décrite au chapitre F-2.2, cette figure montre une anomalie lors de la division du noyau cellulaire AB après irradiation par 10 000 protons de 3 MeV. En effet, si les chromosomes s'alignent correctement sur leur plan de division au début de la métaphase, avec les centrosomes de part et d'autre de ce plan, leur séparation ne s'effectue pas correctement, et ils restent liés par des filaments de chromatine. Ce phénomène persiste au cours des étapes suivantes de la division, et les noyaux fils ABa et ABp gardent une forme anormale et semblent toujours liés par ce pont chromosomique. La division du noyau P1, non-irradié, reste normale, ce qui indique que la division anormale de AB est bien due à l'irradiation. Par ailleurs, l'irradiation ne semble pas avoir d'effet visible sur la formation et la dynamique des fuseaux mitotiques.

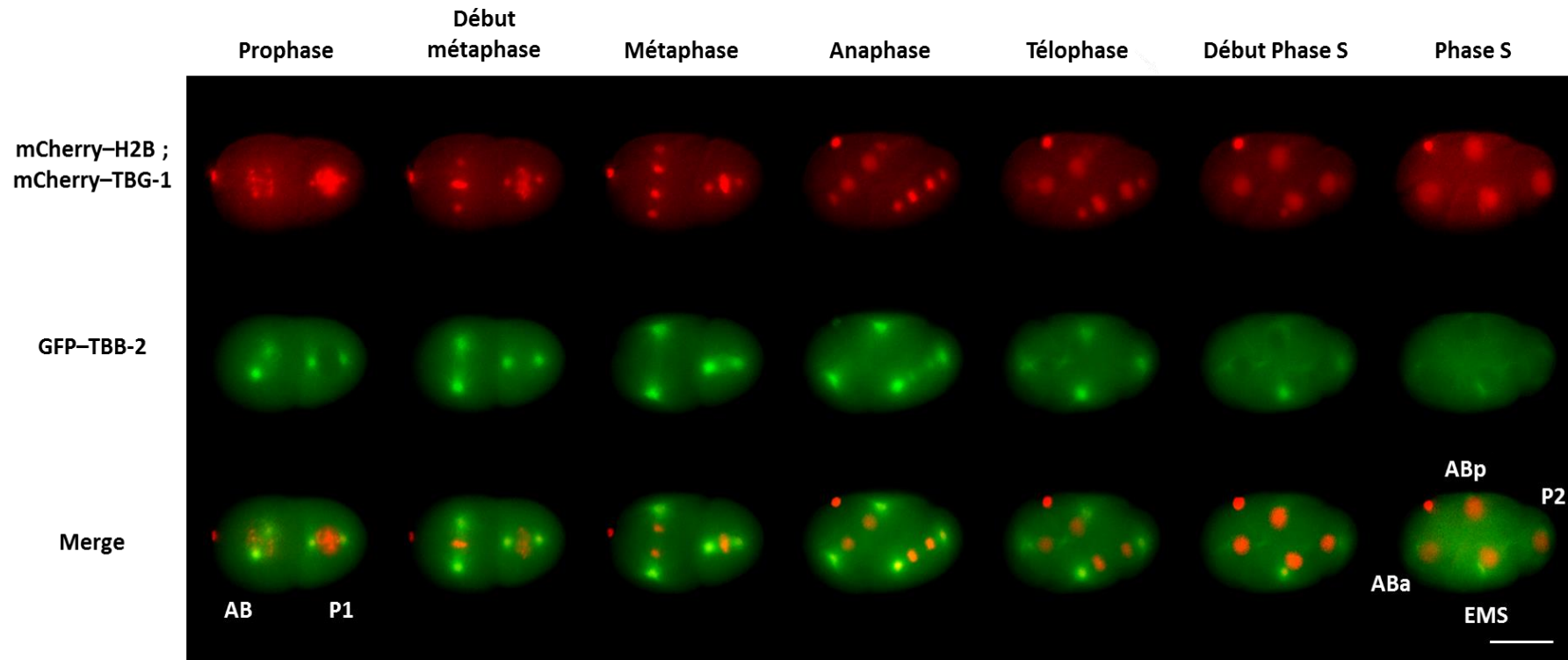


Figure 59 : Acquisition en multi-fluorescence. Les embryons SA250 expriment l'histone H2B et la γ -tubuline fusionnées à la mCherry ainsi que la β -tubuline couplée à la GFP. L'utilisation de cette lignée permet d'observer les chromosomes, les centrosomes (en rouge) et les fuseaux mitotiques (en vert). Échelle : 20 μ m.

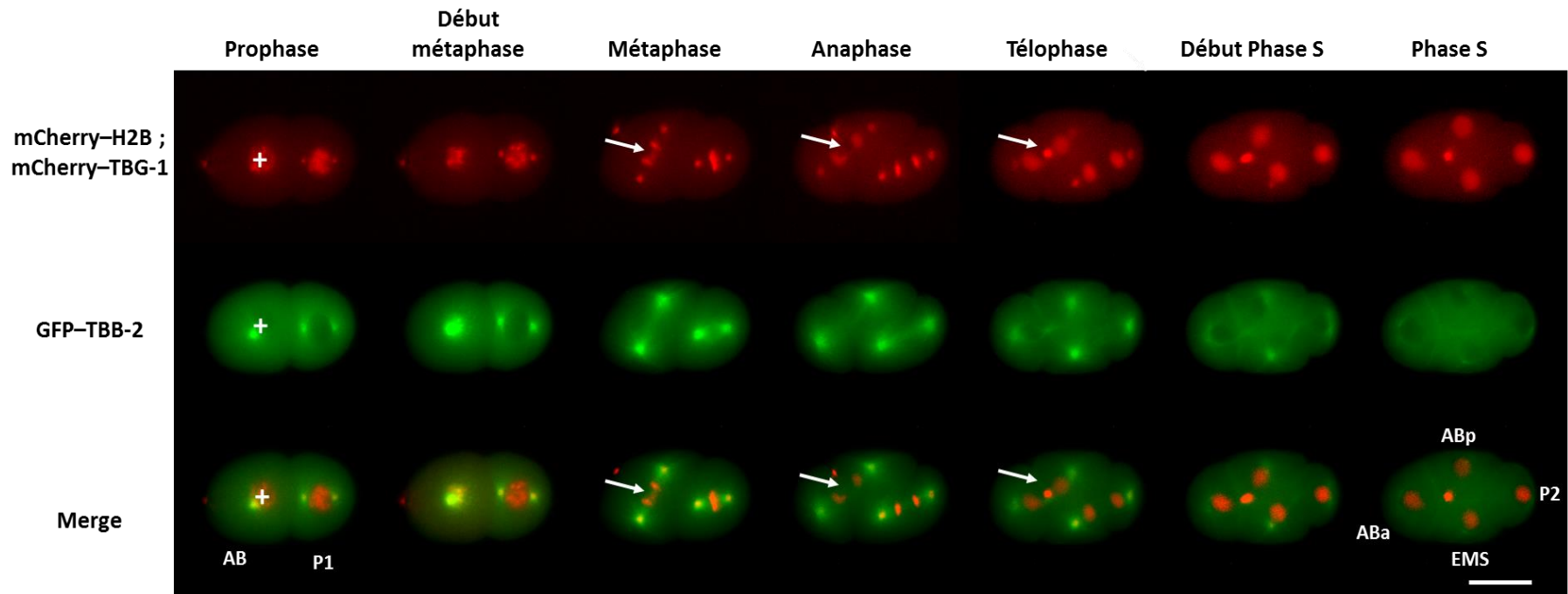


Figure 60 : Irradiation et suivi d'un embryon précoce en multi-fluorescence. Un embryon SA250 a été irradié de manière ciblée avec 10 000 protons avant son entrée en mitose (croix blanche). La dynamique des chromosomes ainsi que la formation des fuseaux mitotiques a été observée par vidéomicroscopie. Après irradiation, un pont chromosomique est visible entre les noyaux des cellules ABa et ABp en métaphase et persiste en fin de mitose (flèches). Échelle : 20 μ m.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a porté sur le développement d'une ligne d'irradiation ciblée par microfaisceau d'ions permettant de répondre à différents types de problématiques posées en radiobiologie.

Mon travail au cours de ces trois années a porté sur différents points :

- La mise en service et la caractérisation de la nouvelle ligne de faisceau d'ions pour l'irradiation sur la plate-forme AIFIRA, ainsi que sa validation pour l'irradiation d'échantillons biologiques vivants.
- Le développement technique et la caractérisation de deux systèmes de détection des ions pour un contrôle absolu du nombre de particules délivrées au sein des échantillons.
- La mise en place de protocoles pour réaliser l'irradiation spécifique d'un compartiment subcellulaire défini aux échelles cellulaire et multicellulaire, *in vitro* et *in vivo*, ainsi que le suivi des conséquences des dommages ADN radio-induits par vidéomicroscopie.
- La modélisation de ces irradiations avec l'outil de simulation Monte-Carlo Geant4 afin de calculer les caractéristiques physiques comme l'énergie déposée dans les échantillons irradiés et la dose associée. Ces données seront en effet utiles pour interpréter les observables biologiques.

1. Une ligne de faisceau opérationnelle pour l'irradiation d'échantillons biologiques vivants

Les résultats présentés dans ce manuscrit montrent que, même si certains points restent à améliorer, la ligne de micro-irradiation par faisceau d'ions est opérationnelle pour des études en radiobiologie. Ce dispositif expérimental a été développé dans un souci de flexibilité et pour pouvoir répondre à des problématiques variées, impliquant des procédures d'irradiation adaptées à la question posée. La précision d'irradiation de $2,0 \pm 0,7 \mu\text{m}$ est tout à fait comparable à celle obtenue sur la plupart des dispositifs en fonctionnement aujourd'hui (Peng *et al* 2001, Greif *et al* 2006, Hable *et al* 2009, Merchant *et al* 2012, Gerardi 2009). L'utilisation, en ligne, de la vidéomicroscopie de fluorescence afin de visualiser les réponses cellulaires précoces est opérationnelle également. Le dispositif mis en place permet donc, en complément de systèmes similaires déjà développés auprès d'accélérateurs d'ions lourds (Hable *et al* 2009, Merk *et al* 2013), une étude dynamique de la réponse cellulaire aux ions légers présentant un TEL de 10 et $150 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$.

Les irradiations cellulaires présentées dans ce travail ont été réalisées sans contrôle absolu du nombre de particules délivrées mais en ajustant un nombre d'impacts moyen pour un temps d'ouverture donné du faisceau. En effet, le développement de détecteurs en transmission s'est

déroulé en parallèle tout au long de ces trois années de thèse, et ils demandent encore des améliorations et des adaptations de manière à pouvoir être utilisés dans des conditions réelles d'irradiation. L'irradiation avec un nombre exact de protons devrait être possible à relativement court terme. L'efficacité de détection du système de scintillateur mince est en effet suffisante pour cela. Il faudra néanmoins coupler son utilisation à la visualisation par microscopie qui implique un éclairage fréquent de l'échantillon.

Concernant la détection des particules α , l'efficacité de détection demande à être améliorée. Les tests sous faisceau de différents matériaux émetteurs d'électrons secondaires ont débuté mais, à ce jour, l'efficacité maximum obtenue de manière reproductible est de l'ordre de 80%, en utilisant les fenêtres recouvertes de CsI fournies par l'équipe de GSI. Ces fenêtres permettent de détecter les ions lourds de haute énergie de GSI avec une efficacité proche de 100% mais il semble que, dans le cas de particules α de 3 MeV, le taux d'émission d'électrons secondaires doive être amélioré. Toutefois, ce résultat est encourageant en ce qui concerne la détection des ions plus lourds fournis par l'installation AMANDE de l'IRSN, même si ce point sera à vérifier une fois le dispositif opérationnel. L'utilisation de détecteurs à gaz basse pression, tel que celui utilisé sur la version précédente de la ligne, pourrait être une solution alternative pour la détection des particules α . Celle-ci impose cependant de garder le faisceau fixe, ce qui limite grandement la rapidité et la flexibilité des irradiations.

D'un point de vue pratique, le système de micro-irradiation présenté dans ce manuscrit a été développé de manière modulaire, permettant ainsi d'envisager des fonctionnalités supplémentaires dans l'avenir (tels que l'utilisation de techniques de photoblanchiment par exemple). L'interface homme-machine, indispensable à l'utilisation en routine du dispositif, a également été pensée de manière modulaire et évolutive.

2. Génération de dommages ADN radio-induits et vidéomicroscopie en ligne : de l'échelle cellulaire à l'échelle multicellulaire

La ligne de micro-irradiation développée au CENBG dispose d'un certain nombre de caractéristiques intéressantes pour l'étude des cascades de protéines impliquées dans la signalisation et la réparation de dommages ADN radio-induits. La possibilité de générer des dommages ADN ciblés, localisés et contrôlés à l'échelle micrométrique ainsi que celle permettant d'irradier les échantillons selon un motif géométrique (ligne, croix, réseau, ...) ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude des dommages ADN complexes (cassures double brins, clusters de dommages, ...) ainsi que la dynamique chromatinienne associée (Girst *et al* 2013, Hlatky 2012, Tobias *et al* 2010).

Ce type d'études pourra s'appuyer sur la vidéomicroscopie en ligne permettant une visualisation en temps réel des premières minutes post-irradiation. Mise en place sur un certain nombre d'installations (Jakob *et al* 2005, Hable *et al* 2009, Giesen *et al* 2011), cette méthode apporte des informations complémentaires aux analyses réalisées par immunomarquage quelques heures après irradiation en permettant une approche dynamique des phénomènes biologiques radio-induits.

Dans ce cadre, la micro-irradiation de noyaux cellulaires exprimant la protéine XRCC1-GFP m'a permis de mettre au point une approche complète de l'irradiation aux traitements des données de fluorescence. En utilisant la capacité de cette protéine à se relocaliser sur les sites ADN endommagés quelques secondes seulement après irradiation, j'ai pu valider le protocole d'irradiation, d'acquisition et de traitement d'images pour en extraire les informations temporelles. Ce protocole a par la suite pu être appliqué pour étudier l'enzyme OGG1-GFP, qui est impliquée dans la réparation des dommages indirects sur l'ADN. À notre connaissance, il s'agit de la première tentative de visualiser l'effet des dommages indirects induits par des particules chargées à l'ADN par vidéomicroscopie. Nous avons donc pu montrer que cette observation est possible mais nécessite néanmoins de recourir à des doses très élevées. Il est à noter que les études présentées ici sur XRCC1 et OGG1 ne sont que des résultats préliminaires. En effet, une caractérisation plus fine des phénomènes observés nécessiterait l'utilisation de lignées cellulaires exprimant ces protéines de manière stable ainsi qu'une caractérisation biologique de la proportion de protéines marquées en fluorescence. Il est par ailleurs envisageable d'aller plus loin sur les techniques de microscopie couplées à l'irradiation par faisceau d'ions. Il apparaîtrait notamment intéressant d'utiliser la méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP – *Fluorescence Recovery After Photobleaching*), qui permettrait d'améliorer la sensibilité de notre système, tout en apportant des informations supplémentaires sur la mobilité des protéines considérées (Merk *et al* 2013).

En parallèle à ces études expérimentales, la caractérisation des réponses cellulaires radio-induites nécessite de réaliser une dosimétrie précise des irradiations effectuées. J'ai donc également mis au point une méthode de calcul numérique par Geant4, basée sur des développements de l'équipe IPCV (Incerti *et al* 2009, Barberet *et al* 2012), afin de pouvoir caractériser le dépôt d'énergie au sein d'un modèle de noyau réaliste au cours d'une micro-irradiation. Cette méthode donne accès à la dose locale, déposée non pas dans la totalité du noyau, mais dans la zone irradiée. Cette dose locale prend ainsi en compte le caractère hautement localisé d'une irradiation par microfaisceau d'ions, et également la différence de densité d'énergie déposée selon le type d'ion utilisé. Elle permet d'interpréter les données biologiques obtenues lors des différentes irradiations en regard des données physiques calculées.

La mise au point de protocoles pour la micro-irradiation et le suivi en temps réel de noyaux cellulaires du nématode *Caenorhabditis elegans*, plus particulièrement de ses embryons au stade précoce, ouvre des perspectives quant à l'étude des dommages radio-induits *in vivo* et, à plus long terme, à l'étude de l'impact des rayonnements ionisants sur le développement d'un individu, de l'embryon au stade adulte. Ce dernier point nécessite encore des développements car nous nous sommes focalisés pour l'instant sur les temps précoces. La génération de dommages ADN radio-induits a ainsi pu être mise en évidence, et ces dommages semblent induire une instabilité chromosomique, qui se traduit par une non-disjonction chromosomique lors de la mitose des cellules irradiées, elle-même entraînant une désorganisation temporelle et morphologique de l'embryon irradié.

Les limites expérimentales rencontrées ici sont celles couramment associées à l'irradiation ciblée par microfaisceau d'ions, à savoir la faible quantité d'échantillons irradiés. Afin d'avoir le meilleur compromis possible entre les informations obtenues et le nombre d'échantillons, nous nous sommes limités à un suivi en ligne de 1 heure. Toutefois, à partir du stade 4-cellules des embryons, les divisions cellulaires ont lieu dans le plan orthogonal au plan de l'image, rendant alors difficile le suivi des noyaux et des ponts inter-chromosomiques radio-induits. Pour un suivi plus long de l'effet d'une micro-irradiation au stade embryonnaire précoce sur le développement des nématodes, il serait intéressant d'avoir la possibilité de remettre les embryons irradiés en culture afin de déceler d'éventuelles anomalies de développement, de l'embryon précoce jusqu'à un ver adulte, voire des effets sur leur descendance (instabilité génomique, surabondance de mâles, ...).

3. Premières applications en radiobiologie

Au cours de ce travail de thèse, les premières utilisations de la ligne d'irradiation pour des études de radiobiologie ont également commencé en collaboration avec l'Institut Bergonié, centre régional de lutte contre le cancer de Bordeaux. Il s'agit d'études de la radiosensibilité de sarcomes à des irradiations par microfaisceau d'ions avec des particules de haut TEL.

Des études préliminaires ont ainsi pu être menées en irradiant une lignée cellulaire issue de sarcomes par microfaisceau de particules alpha (haut TEL) sur la ligne du CENBG, et par un faisceau d'électrons (faible TEL) issus d'un accélérateur médical de type Clinac de l'institut Bergonié (VARIAN® Medical Systems). Cela a permis de comparer la radiosensibilité de cette lignée à ces deux types de particules. Afin de réaliser les irradiations dans les mêmes conditions de dose absorbée, les outils de modélisation développés pour la dosimétrie du microfaisceau ont pu être transposés aux irradiations par Clinac. Ce travail a permis de se placer dans un régime de dose identique, bien que les modes d'irradiation soient différents (faisceau ponctuel de particules α

de 3 MeV et irradiation homogène par des électrons de 9 MeV). L'intégrité génomique des lignées irradiées a pu être analysée à différents temps après irradiation grâce à des techniques de cytogénétique dont dispose le laboratoire INSERM/VINCO de l'institut Bergonié. Des résultats préliminaires ne montrant pas de différence significative entre une irradiation à haut TEL où à TEL plus faible ont été obtenus. Ces résultats, très préliminaires, permettent d'envisager une étude plus systématique de l'impact des irradiations à haut TEL sur des lignées radiosensibles et radorésistantes.

Du point de vue de l'irradiation par microfaisceau, ce type d'expérience nécessite une adaptation importante. En effet, il est nécessaire d'irradier plusieurs milliers de cellules afin de pouvoir procéder à des analyses génomiques par la suite. Nous avons dans un premier temps choisi une irradiation en réseau (non ciblée) de manière à pouvoir irradier environ 10 000 cellules en une dizaine de minutes. Dans l'avenir, ces études vont se poursuivre et il serait intéressant de pouvoir mieux maîtriser la dose délivrée dans chaque cellule ainsi que le compartiment cellulaire touché. Un travail devra alors être effectué pour réduire le nombre de cellules nécessaires et/ou optimiser l'irradiation ciblée de manière entièrement automatique.

Il est à noter que ce travail va se poursuivre dans les années qui viennent dans le cadre du projet européen Marie Curie SPRITE regroupant différents microfaisceaux pour l'irradiation cellulaire en Europe.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-
- Agostinelli S, Allison J, Amako K, Apostolakis J, Araujo H, Arce P, Asai M, Axen D, Banerjee S, Barrand G, Behner F, Bellagamba L, Boudreau J, Broglia L, Brunengo A, Burkhardt H, Chauvie S, Chuma J, Chytrcek R, Cooperman G, Cosmo G, Degtyarenko P, Dell'Acqua A, Depaola G, Dietrich D, Enami R, Feliciello A, Ferguson C, Fesefeldt H, Folger G, Foppiano F, Forti A, Garelli S, Giani S, Giannitrapani R, Gibin D, Gómez Cadenas J J, González I, Gracia Abril G, Greeniaus G, Greiner W, Grichine V, Grossheim A, Guatelli S, Gumplinger P, Hamatsu R, Hashimoto K, Hasui H, Heikkinen A, Howard A, Ivanchenko V, Johnson A, Jones F W, Kallenbach J, Kanaya N, Kawabata M, Kawabata Y, Kawaguti M, Kelner S, Kent P, Kimura A, Kodama T, Kokoulin R, Kossov M, Kurashige H, Lamanna E, Lampén T, Lara V, Lefebure V, Lei F, Liendl M, Lockman W, Longo F, Magni S, Maire M, Medernach E, Minamimoto K, Mora de Freitas P, Morita Y, Murakami K, Nagamatsu M, Nartallo R, Nieminen P, Nishimura T, Ohtsubo K, Okamura M, O'Neale S, Oohata Y, Paech K, Perl J, Pfeiffer A, Pia M G, Ranjard F, Rybin A, Sadilov S, Di Salvo E, Santin G, Sasaki T, et al 2003 Geant4—a simulation toolkit *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* **506** 250–303 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168900203013688>
- Alard J-P, Bodez V, Tchirkov A, Nénnot M-L, Arnold J, Cressin S, Rapp M, Verrelle P and Dionet C 2002 Simulation of neutron interactions at the single-cell level. *Radiat. Res.* **158** 650–6 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385643>
- Allison J, Amako K, Apostolakis J, Araujo H, Arce Dubois P, Asai M, Barrand G, Capra R, Chauvie S, Chytrcek R, Cirrone G A P, Cooperman G, Cosmo G, Cuttone G, Daquino G G, Donszelmann M, Dressel M, Folger G, Foppiano F, Generowicz J, Grichine V, Guatelli S, Gumplinger P, Heikkinen A, Hrivnacova I, Howard A, Incerti S, Ivanchenko V, Johnson T, Jones F, Koi T, Kokoulin R, Kossov M, Kurashige H, Lara V, Larsson S, Lei F, Link O, Longo F, Maire M, Mantero A, Mascialino B, McLaren I, Mendez Lorenzo P, Minamimoto K, Murakami K, Nieminen P, Pandola L, Parlati S, Peralta L, Perl J, Pfeiffer A, Pia M G, Ribon A, Rodrigues P, Russo G, Sadilov S, Santin G, Sasaki T, Smith D, Starkov N, Tanaka S, Tcherniaev E, Tome B, Trindade A, Truscott P, Urban L, Verderi M, Walkden A, Wellisch J P, Williams D C, Wright D and Yoshida H 2006 Geant4 developments and applications *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **53** 270–8 Online: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=1610988>
- Amouroux R, Campalans A, Epe B and Radicella J P 2010 Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res.* **38** 2878–90 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2875005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Aten J a, Stap J, Krawczyk P M, van Oven C H, Hoebe R a, Essers J and Kanaar R 2004 Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* **303** 92–5 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704429>
- Bailly I, Champion C, Massiot P, Savarin P, Poncy J L, Cressin S, Alloy G, Jacob V and Petibon E 2002 Development of an experimental system for biological studies: Scintillation and solid-track detectors as dose monitors *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **187** 137–48 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X01008424>
- Barberet P 2003 *Développement d'une ligne d'irradiation microfaisceau en mode ion par ion pour la radiobiologie expérimentale à l'échelle cellulaire* (Université Bordeaux 1) Online: http://grenet.drimm.u-bordeaux1.fr/pdf/2003/BARBERET_PHILIPPE_2003.pdf

- Barberet P, Balana A, Incerti S, Michelet-Habchi C, Moretto P and Pouthier T 2005 Development of a focused charged particle microbeam for the irradiation of individual cells *Rev. Sci. Instrum.* **76** 015101 Online: <http://link.aip.org/link/RSINAK/v76/i1/p015101/s1&Agg=doi>
- Barberet P, Daudin L, Gordillo N, Sorieul S, Simon M, Seznec H, Idarraga I, Incerti S, Balana A and Moretto P 2011 First results obtained using the CENBG nanobeam line: Performances and applications *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269** 2163–7 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X11002199>
- Barberet P, Incerti S, Andersson F, Delalee F, Serani L and Moretto P 2009 Technical description of the CENBG nanobeam line *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267** 2003–7 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X09003309>
- Barberet P, Vianna F, Karamitros M, Brun T, Gordillo N, Moretto P, Incerti S and Seznec H 2012 Monte-Carlo dosimetry on a realistic cell monolayer geometry exposed to alpha particles. *Phys. Med. Biol.* **57** 2189–207 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22456322>
- Beaton L a, Burn T a, Stocki T J, Chauhan V and Wilkins R C 2011 Development and characterization of an in vitro alpha radiation exposure system. *Phys. Med. Biol.* **56** 3645–58 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21610295>
- Bekker-Jensen S and Mailand N 2010 Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*. **9** 1219–28 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21035408>
- Belli M, Cherubini R, Galeazzi G, Mazzucato S, Moschini G, Saporita O, Simone G and Tabocchini M A 1987 Proton irradiation facility for radiobiological studies at a 7 MV Van de Graaff accelerator *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* **256** 576–80 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168900287903044>
- Belyakov O V, Malcolmson a M, Folkard M, Prise K M and Michael B D 2001 Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts. *Br. J. Cancer* **84** 674–9 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2363796&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Belyakov O V, Mitchell S a, Parikh D, Randers-Pehrson G, Marino S a, Amundson S a, Geard C R and Brenner D J 2005 Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** 14203–8 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1202386&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bertucci A, Pocock R D J, Randers-Pehrson G and Brenner D J 2009 Microbeam irradiation of the *C. elegans* nematode. *J. Radiat. Res.* **50 Suppl A** A49–54 Online: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jrr/08132S?from=CrossRef>
- Besserer J, de Boer J, Dellert M, Gahn C, Moosburger M, Pemler P, Quicken P, Distel L and Schüßler H 1999 An irradiation facility with a vertical beam for radiobiological studies *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* **430** 154–60 Online: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168900299001953>

-
- Brauchle M, Baumer K and Gönczy P 2003 Differential activation of the DNA replication checkpoint contributes to asynchrony of cell division in *C. elegans* embryos. *Curr. Biol.* **13** 819–27 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12747829>
- Brem R and Hall J 2005 XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res.* **33** 2512–20 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1088068&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Brenner S 1974 The Genetics of *Caenorhabditis elegans* *Genetics* 71–94 Online: <http://www.genetics.org/content/77/1/71.short>
- Buonanno M, Garty G, Grad M, Gendrel M, Hobert O and Brenner D J 2013 Microbeam irradiation of *C. elegans* nematode in microfluidic channels. *Radiat. Environ. Biophys.* Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23942865>
- Caldecott K W 2003 XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. **2** 955–69 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786403001186>
- Campalans A, Amouroux R, Bravard A, Epe B and Radicella J P 2007 UVA irradiation induces relocalisation of the DNA repair protein hOGG1 to nuclear speckles. *J. Cell Sci.* **120** 23–32 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148573>
- Campalans A, Kortulewski T, Amouroux R, Menoni H, Vermeulen W and Radicella J P 2013 Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair - Supplementary data. *Nucleic Acids Res.* 1–4 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23355608>
- Champion C, Zanotti-Fregonara P and Hindié E 2008 CELLDOSE: a Monte Carlo code to assess electron dose distribution--S values for ¹³¹I in spheres of various sizes. *J. Nucl. Med.* **49** 151–7 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077517>
- Choi V W Y, Konishi T, Oikawa M, Iso H, Cheng S H and Yu K N 2010 Adaptive response in zebrafish embryos induced using microbeam protons as priming dose and X-ray photons as challenging dose. *J. Radiat. Res.* **51** 657–64 Online: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jrr/10054?from=CrossRef>
- Choi V W Y, Yum E H W, Konishi T, Oikawa M, Cheng S H and Yu K N 2012 Triphasic low-dose response in zebrafish embryos irradiated by microbeam protons. *J. Radiat. Res.* **53** 475–81 Online: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jrr/11146?from=CrossRef>
- Christmann M, Tomicic M T, Roos W P and Kaina B 2003 Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193** 3–34 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X03002877>
- Cookson J A and Pilling F D 1973 The use of focused ion beams for analysis *Thin Solid Films* **19** 381–5 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0040609073900746>
- Daudin L, Barberet P, Serani L and Moretto P 2013 CRionScan: A stand-alone real time controller designed to perform ion beam imaging, dose controlled irradiation and proton beam writing *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **306** 64–70 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X12008038>

- Dinant C, de Jager M, Essers J, van Cappellen W a, Kanaar R, Houtsmuller A B and Vermeulen W 2007 Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods. *J. Cell Sci.* **120** 2731–40 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646676>
- Douglass M, Bezak E and Penfold S 2012 Development of a randomized 3D cell model for Monte Carlo microdosimetry simulations. *Med. Phys.* **39** 3509–19 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22755731>
- Du G, Fischer B E, Voss K-O, Becker G, Taucher-Scholz G, Kraft G and Thiel G 2008 The absence of an early calcium response to heavy-ion radiation in Mammalian cells. *Radiat. Res.* **170** 316–26 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18763861>
- Durante M and Friedl A a 2011 New challenges in radiobiology research with microbeams. *Radiat. Environ. Biophys.* **50** 335–8 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21667289>
- Ferrari A, Sala P R, Fassò A and Ranft J 2005 *FLUKA: A multi-particle transport code (program version 2005)* (Geneva: CERN)
- Fischer B E, Voss K-O and Du G 2009 Targeted irradiation of biological cells using an ion microprobe – Why a small beam spot is not sufficient for success *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267** 2122–4 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X09003565>
- Folkard M, Prise K M, Vojnovic B, Gilchrist S, Schettino G, Belyakov O V., Ozols A and Michael B D 2001 The impact of microbeams in radiation biology *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **181** 426–30 Online: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X01004633>
- Folkard M, Prise K M, Vojnovic B, Newman H C, Roper M J and Michael B D 1996 Inactivation of V79 cells by low-energy protons, deuterons and helium-3 ions. *Int. J. Radiat. Biol.* **69** 729–38 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8691025>
- Folkard M, Vojnovic B, Hollis K J, Bowey A G, Watts S J, Schettino G, Prise K M and Michael B D 1997a A charged-particle microbeam: II. A single-particle micro-collimation and detection system. *Int. J. Radiat. Biol.* **72** 387–95 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343104>
- Folkard M, Vojnovic B, Prise K M, Bowey A G, Locke R J, Schettino G and Michael B D 1997b A charged-particle microbeam: I. Development of an experimental system for targeting cells individually with counted particles. *Int. J. Radiat. Biol.* **72** 375–85 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343103>
- Fournier C, Becker D, Winter M, Barberet P, Heiss M, Fischer B, Topsch J and Taucher-Scholz G 2007 Cell cycle-related bystander responses are not increased with LET after heavy-ion irradiation. *Radiat. Res.* **167** 194–206 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17390727>
- Friedrich T, Scholz U, Elsässer T, Durante M and Scholz M 2013 Systematic analysis of RBE and related quantities using a database of cell survival experiments with ion beam irradiation. *J. Radiat. Res.* **54** 494–514 Online:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3650740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Fukamoto K, Shirai K, Sakata T, Sakashita T, Funayama T, Hamada N, Wada S, Kakizaki T, Shimura S, Kobayashi Y and Kiguchi K 2007 Development of the irradiation method for the first instar silkworm larvae using locally targeted heavy-ion microbeam. *J. Radiat. Res.* **48** 247–53 Online: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jrr/06066?from=CrossRef>
- Geard C R, Jenkins-Baker G, Marino S A and Ponnaiya B 2002 Novel approaches with track segment alpha particles and cell co-cultures in studies of bystander effects. *Radiat. Prot. Dosimetry* **99** 233–6 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194293>
- Gerardi S 2009 Ionizing radiation microbeam facilities for radiobiological studies in Europe. *J. Radiat. Res.* **50 Suppl A** A13–20 Online: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jrr/08133S?from=CrossRef>
- Giesen U, Langner F, Mielke C, Mosconi M and Dirks W G 2011 Online imaging of initial DNA damages at the PTB microbeam. *Radiat. Prot. Dosimetry* **143** 349–52 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149293>
- Girst S, Hable V, Drexler G a, Greubel C, Siebenwirth C, Haum M, Friedl a a and Dollinger G 2013 Subdiffusion supports joining of correct ends during repair of DNA double-strand breaks. *Sci. Rep.* **3** 2511 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3753591&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Greif K, Beverung W, Langner F, Frankenberg D, Gellhaus A and Banaz-Yasar F 2006 The PTB microbeam: a versatile instrument for radiobiological research. *Radiat. Prot. Dosimetry* **122** 313–5 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17164277>
- Greif K-D, Brede H J, Frankenberg D and Giesen U 2004 The PTB single ion microbeam for irradiation of living cells *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **217** 505–12 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X03022109>
- Gressier V, Guerre-Chaley J F, Lacoste V, Lebreton L, Pelcot G, Pochat J L, Bolognese-Milstajn T and Champion D 2004 AMANDE: a new facility for monoenergetic neutron fields production between 2 keV and 20 MeV. *Radiat. Prot. Dosimetry* **110** 49–52 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353620>
- Greubel C, Assmann W, Burgdorf C, Dollinger G, Du G, Hable V, Hapfelmeier A, Hertenberger R, Kneschaurek P, Michalski D, Molls M, Reinhardt S, Röper B, Schell S, Schmid T E, Siebenwirth C, Wenzl T, Zlobinskaya O and Wilkens J J 2011 Scanning irradiation device for mice in vivo with pulsed and continuous proton beams. *Radiat. Environ. Biophys.* **50** 339–44 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556847>
- Greubel C, Hable V, Drexler G a, Hauptner A, Dietzel S, Strickfaden H, Baur I, Krücken R, Cremer T, Dollinger G and Friedl A a 2008 Competition effect in DNA damage response. *Radiat. Environ. Biophys.* **47** 423–9 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18648839>
- Griffith L G and Swartz M a 2006 Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7** 211–24 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16496023>

- Grigaravicius P, Rapp A and Greulich K O 2009 A direct view by immunofluorescent comet assay (IFCA) of DNA damage induced by nicking and cutting enzymes, ionizing (137)Cs radiation, UV-A laser microbeam irradiation and the radiomimetic drug bleomycin. *Mutagenesis* **24** 191–7 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19139057>
- Grime G W and Watt F 1984 *Beam optics of quadrupole probe-forming systems* (Hilger)
- Hable V, Drexler G a, Brüning T, Burgdorf C, Greubel C, Derer A, Seel J, Strickfaden H, Cremer T, Friedl A a and Dollinger G 2012 Recruitment Kinetics of DNA Repair Proteins Mdc1 and Rad52 but Not 53BP1 Depend on Damage Complexity. *PLoS One* **7** e41943 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3408406&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hable V, Greubel C, Bergmaier A, Reichart P, Hauptner A, Krücken R, Strickfaden H, Dietzel S, Cremer T, Drexler G a, Friedl A a. and Dollinger G 2009 The live cell irradiation and observation setup at SNAKE *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267** 2090–7 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X09003504>
- Hall E J 2000 Radiation, the two-edged sword: cancer risks at high and low doses. *Cancer J.* **6** 343–50 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11131480>
- Hamada N, Ni M, Funayama T, Sakashita T and Kobayashi Y 2008 Temporally distinct response of irradiated normal human fibroblasts and their bystander cells to energetic heavy ions. *Mutat. Res.* **639** 35–44 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18082226>
- Hauptner A, Dietzel S, Drexler G A, Reichart P, Krücken R, Cremer T, Friedl A A and Dollinger G 2004 Microirradiation of cells with energetic heavy ions. *Radiat. Environ. Biophys.* **42** 237–45 Online: <http://link.springer.com/10.1007/s00411-003-0222-7>
- Hei T K, Wu L J, Liu S X, Vannais D, Waldren C A and Randers-Pehrson G 1997 Mutagenic effects of a single and an exact number of alpha particles in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94** 3765–70 Online: <http://www.pnas.org/content/94/8/3765.short>
- Heiss M, Fischer B E, Jakob B, Fournier C, Becker G and Taucher-Scholz G 2006 Targeted irradiation of Mammalian cells using a heavy-ion microprobe. *Radiat. Res.* **165** 231–9 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16435921>
- Hlatky L 2012 Double-strand break motions shift radiation risk notions? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109** 351–2 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3258590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hofmann E R, Milstein S, Boulton S J, Ye M, Hofmann J J, Stergiou L, Gartner A, Vidal M and Hengartner M O 2002 *Caenorhabditis elegans* HUS-1 is a DNA damage checkpoint protein required for genome stability and EGL-1-mediated apoptosis. *Curr. Biol.* **12** 1908–18 Online: [http://119.93.223.179/ScienceDirect/Current Biology/12-22/sdarticle_017.pdf](http://119.93.223.179/ScienceDirect/Current%20Biology/12-22/sdarticle_017.pdf)
- Incerti S, Baldacchino G, Bernal M, Capra R, Champion C, Francis Z, Guèye P, Mantero A, Mascialino B, Moretto P, Nieminen P, Villagrasa C and Zacharatou C 2010 THE GEANT4-DNA PROJECT *Int. J. Model. Simulation, Sci. Comput.* **01** 157–78 Online: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S1793962310000122>

-
- Incerti S, Seznec H, Simon M, Barberet P, Habchi C and Moretto P 2009 Monte Carlo dosimetry for targeted irradiation of individual cells using a microbeam facility. *Radiat. Prot. Dosimetry* **133** 2–11 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174380>
- Jakob B, Rudolph J H, Gueven N, Lavin M F and Taucher-Scholz G 2005 Live cell imaging of heavy-ion-induced radiation responses by beamline microscopy. *Radiat. Res.* **163** 681–90 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15913400>
- Kaitna S, Mendoza M, Jantsch-Plunger V and Glotzer M 2000 Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr. Biol.* **10** 1172–81 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050385>
- Khodja H, Hanot M, Carrière M, Hoarau J and Angulo J F 2009 The single-particle microbeam facility at CEA-Saclay *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **267** 1999–2002 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X09003292>
- Kisieleska J, Lu P and Whitaker M 2005 GFP-PCNA as an S-phase marker in embryos during the first and subsequent cell cycles. *Biol. Cell* **97** 221–9 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15584900>
- Kong X, Mohanty S K, Stephens J, Heale J T, Gomez-Godinez V, Shi L Z, Kim J-S, Yokomori K and Berns M W 2009 Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **37** e68 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2685111&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Konishi T, Oikawa M, Suya N, Ishikawa T, Maeda T, Kobayashi A, Shiomi N, Kodama K, Hamano T, Homma-Takeda S, Isono M, Hieda K, Uchihori Y and Shirakawa Y 2013 SPICE-NIRS microbeam: a focused vertical system for proton irradiation of a single cell for radiobiological research. *J. Radiat. Res.* **54** 736–47 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287773>
- Kraft G, Daues H W, Fischer B, Kopf U, Liebold H P, Quis D, Stelzer H, Kiefer J, Schöpfer F, Schneider E, Weber K, Wulf H and Dertinger H 1980 Irradiation chamber and sample changer for biological samples *Nucl. Instruments Methods* **168** 175–9 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0029554X80912495>
- Lan L, Nakajima S, Oohata Y, Takao M, Okano S, Masutani M, Wilson S H and Yasui A 2004 In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** 13738–43 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=518826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Limoli C L and Ward J F 1993 A new method for introducing double-strand breaks into cellular DNA. *Radiat. Res.* **134** 160–9 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683818>
- MCNP X 2003 *Monte Carlo Team, MCNP--A General Purpose Monte Carlo N-Particle Transport Code, Version 5*
- Merchant M J, Jeynes J C G, Grime G W, Palitsin V, Tullis I D W, Barber P R, Vojnovic B, Webb R P and Kirkby K J 2012 A focused scanning vertical beam for charged particle irradiation of

- living cells with single counted particles. *Radiat. Res.* **178** 182–90 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22823572>
- Merk B, Voss K-O, Müller I, Fischer B E, Jakob B, Taucher-Scholz G, Trautmann C and Durante M 2013 Photobleaching setup for the biological end-station of the darmstadt heavy-ion microprobe *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **306** 81–4 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X1300030X>
- Miller J H, Chrisler W B, Wang X and Sowa M B 2011 Confocal microscopy for modeling electron microbeam irradiation of skin. *Radiat. Environ. Biophys.* **50** 365–9 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21604000>
- Miller R C, Randers-Pehrson G, Geard C R, Hall E J and Brenner D J 1999 The oncogenic transforming potential of the passage of single alpha particles through mammalian cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** 19–22 Online: <http://www.pnas.org/content/96/1/19.short>
- Moretto P, Michelet C, Balana A, Barberet P, Przybylowicz W ., Slabbert J ., Prozesky V ., Pineda C ., Brut G, Laurent G and Lhoste F 2001 Development of a single ion irradiation system at CENBG for applications in radiation biology *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **181** 104–9 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X01006243>
- Morgan W F and Sowa M B 2005 Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** 14127–8 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1242332&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mortusewicz O and Leonhardt H 2007 XRCC1 and PCNA are loading platforms with distinct kinetic properties and different capacities to respond to multiple DNA lesions. *BMC Mol. Biol.* **8** 81 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2039748&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mosconi M, Giesen U, Langner F, Mielke C, Dalla Rosa I and Dirks W G 2011 53BP1 and MDC1 foci formation in HT-1080 cells for low- and high-LET microbeam irradiations. *Radiat. Environ. Biophys.* **50** 345–52 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21559952>
- Mous D J W, Haitsma R G, Butz T, Flaggmeyer R-H, Lehmann D and Vogt J 1997 The novel ultrastable HVEE 3.5 MV Singletron™ accelerator for nanoprobe applications *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **130** 31–6 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X97001869>
- Nikjoo H, Uehara S, Emfietzoglou D and Cucinotta F a. 2006 Track-structure codes in radiation research *Radiat. Meas.* **41** 1052–74 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350448706001338>
- Nikjoo H, Uehara S, Wilson W E, Hoshi M and Goodhead D T 1998 Track structure in radiation biology: theory and applications. *Int. J. Radiat. Biol.* **73** 355–64 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9587072>
- Peng S, Folkard M, Gilchrist S, Locke R J, Yu Z and Michael B D 2001 Measurements of the targeting accuracy of the Gray Laboratory charged-particle microbeam *Nucl. Instruments*

-
- Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **179** 145–50 Online:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X01003883>
- Polo S E and Jackson S P 2011 Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.* **25** 409–33 Online:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3049283&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pouthier T 2006 *Mise en évidence de cassures double brin de l'ADN induites par irradiation de kératinocytes humains en microfaisceau alpha* (Université Bordeaux 1) Online:
<http://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00353412/>
- Prakrajang K, Jeynes J C G, Merchant M J, Kirkby K, Kirkby N, Thopan P and Yu L D 2013 MeV single-ion beam irradiation of mammalian cells using the Surrey vertical nanobeam, compared with broad proton beam and X-ray irradiations *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **307** 586–91 Online:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X13003303>
- Prise K M, Belyakov O V, Folkard M and Michael B D 1998 Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int. J. Radiat. Biol.* **74** 793–8 Online:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9881726>
- Prise K M, Folkard M, Malcolmson a M, Pullar C H, Schettino G, Bowey a G and Michael B D 2000 Single ion actions: the induction of micronuclei in V79 cells exposed to individual protons. *Adv. Space Res.* **25** 2095–101 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11542861>
- Prise K M and Schettino G 2011 Microbeams in radiation biology: review and critical comparison. *Radiat. Prot. Dosimetry* **143** 335–9 Online:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3050582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Prise K M, Schettino G, Vojnovic B, Belyakov O and Shao C 2009 Microbeam studies of the bystander response. *J. Radiat. Res.* **50 Suppl A** A1–6 Online:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2855959/>
- Randers-Pehrson G, Geard C R, Johnson G, Elliston C D and Brenner D J 2001 The Columbia University single-ion microbeam. *Radiat. Res.* **156** 210–4 Online:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448243>
- Roeske J C and Hoggarth M 2007 Alpha-particle Monte Carlo simulation for microdosimetric calculations using a commercial spreadsheet. *Phys. Med. Biol.* **52** 1909–22 Online:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374919>
- Salvat F, Fernández-Varea J and Sempau J 2006 PENELOPE-2006: A code system for Monte Carlo simulation of electron and photon transport *Work. Proc.* Online: <https://www.oecd-neo.org/science/pubs/2006/nea6222-penelope.pdf>
- Sawant S G, Randers-Pehrson G, Geard C R, Brenner D J and Hall E J 2001 The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells. *Radiat. Res.* **155** 397–401 Online:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182789>

- Scampoli P, Casale M, Durante M, Grossi G, Pugliese M and Gialanella G 2001 Low-energy light ion irradiation beam-line for radiobiological studies *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **174** 337–43 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X00006224>
- Schettino G, Ghita M, Richard D J and Prise K M 2011 Spatiotemporal investigations of DNA damage repair using microbeams. *Radiat. Prot. Dosimetry* **143** 340–3 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149324>
- Schmid T E, Dollinger G, Hable V, Greubel C, Zlobinskaya O, Michalski D, Molls M and Röper B 2010 Relative biological effectiveness of pulsed and continuous 20 MeV protons for micronucleus induction in 3D human reconstructed skin tissue. *Radiother. Oncol.* **95** 66–72 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347168>
- Schneider C A, Rasband W S and Eliceiri K W 2012 NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9** 671–5 Online: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.2089>
- Sedelnikova O a, Nakamura A, Kovalchuk O, Koturbash I, Mitchell S a, Marino S a, Brenner D J and Bonner W M 2007 DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res.* **67** 4295–302 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483342>
- Shao C, Furusawa Y, Kobayashi Y, Funayama T and Wada S 2003 Bystander effect induced by counted high-LET particles in confluent human fibroblasts: a mechanistic study. *FASEB J.* **17** 1422–7 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12890695>
- Simon M, Barberet P, Delville M-H, Moretto P and Seznec H 2011 Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Nanotoxicology* **5** 125–39 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21425910>
- Sonneville R, Querenet M, Craig A, Gartner A and Blow J J 2012 The dynamics of replication licensing in live *Caenorhabditis elegans* embryos. *J. Cell Biol.* **196** 233–46 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3265957&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Splinter J, Jakob B, Lang M, Yano K, Engelhardt J, Hell S W, Chen D J, Durante M and Taucher-Scholz G 2010 Biological dose estimation of UVA laser microirradiation utilizing charged particle-induced protein foci. *Mutagenesis* **25** 289–97 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2902920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Stiernagle T 2006 Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* 1–11 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050451>
- Strome S, Powers J, Dunn M, Reese K, Malone C J, White J, Seydoux G and Saxton W 2001 Spindle dynamics and the role of gamma-tubulin in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol. Biol. Cell* **12** 1751–64 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=37338&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

-
- Sugimoto T, Dazai K, Sakashita T, Funayama T, Wada S, Hamada N, Kakizaki T, Kobayashi Y and Higashitani A 2006 Cell cycle arrest and apoptosis in *Caenorhabditis elegans* germline cells following heavy-ion microbeam irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **82** 31–8 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546901>
- Takanami T, Zhang Y, Aoki H, Abe T, Yoshida S, Takahashi H, Horiuchi S and Higashitani A 2003 Efficient repair of DNA damage induced by heavy ion particles in meiotic prophase I nuclei of *Caenorhabditis elegans*. *J. Radiat. Res.* **44** 271–6 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14646232>
- Tartier L, Spenlehauer C, Newman H C, Folkard M, Prise K M, Michael B D, Ménissier-de Murcia J and de Murcia G 2003 Local DNA damage by proton microbeam irradiation induces poly(ADP-ribose) synthesis in mammalian cells. *Mutagenesis* **18** 411–6 Online: <http://www.mutage.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/mutage/geg015>
- Tobias F, Durante M, Taucher-Scholz G and Jakob B 2010 Spatiotemporal analysis of DNA repair using charged particle radiation. *Mutat. Res.* **704** 54–60 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944777>
- Toya M, Iida Y and Sugimoto A 2010 Imaging of mitotic spindle dynamics in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Methods Cell Biol.* **97** 359–72 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719280>
- Tung C J, Liu C S, Wang J P and Chang S L 2004 Calculations of cellular microdosimetry parameters for alpha particles and electrons. *Appl. Radiat. Isot.* **61** 739–43 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308137>
- Watt F and Grime G W 1987 *Principles and Applications of High-Energy Ion Microbeams* (Taylor & Francis)
- Wéra a.-C, Riquier H, Heuskin A.-C, Michiels C and Lucas S 2011 In vitro irradiation station for broad beam radiobiological experiments *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **269** 3120–4 Online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X11004551>
- Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren C a, Vannais D, Hall E J and Hei T K 2000 Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** 2099–104 Online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Zielinska A, Davies O T, Meldrum R a and Hodges N J 2011 Direct visualization of repair of oxidative damage by OGG1 in the nuclei of live cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **25** 1–7 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21322094>
- Zirkle R E and Bloom W 1953 Irradiation of parts of individual cells. *Science* **117** 487–93 Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13056589>

Résumé : Les microfaisceaux d'ions ont, au cours de ces dernières décennies, montré leur efficacité dans l'étude des effets des rayonnements ionisants sur le vivant notamment concernant les effets des faibles doses ou l'étude de l'effet de proximité. Le CENBG dispose depuis 2003 d'un dispositif permettant la micro-irradiation ciblée d'échantillons biologiques vivants. Les applications des microfaisceaux dans ce domaine se sont récemment diversifiées et des études plus fines sur les mécanismes de réparation des dommages ADN radio-induits aux échelles cellulaire et multicellulaire sont devenues possibles via les évolutions en imagerie par fluorescence et en biologie cellulaire. Ces approches ont nécessité une évolution importante de l'instrumentation de la ligne de micro-irradiation du CENBG qui a été entièrement redessinée et reconstruite dans un souci d'optimisation d'apport de nouvelles fonctionnalités. Les objectifs de mes travaux ont été i) la mise en service du dispositif, ii) la caractérisation des performances du système, iii) la mise en place de protocoles pour l'irradiation ciblée à dose contrôlée aux échelles cellulaire et multicellulaire, *in vitro* et *in vivo*, et le suivi en ligne des conséquences précoces de cette irradiation, iv) la modélisation des irradiations afin d'interpréter les observables biologiques au regard des données physiques calculées.

Ces travaux ont permis i) de caractériser les performances du dispositif : une taille de faisceau d'environ 2 μm sur cible et une précision de tir de $\pm 2 \mu\text{m}$, de développer des systèmes de détection d'ions pour un contrôle absolu de la dose délivrée, ii) d'induire des dommages ADN fortement localisés *in vitro*, et de visualiser en ligne le recrutement de protéines impliquées dans la réparation de ces dommages, iii) d'appliquer ces protocoles pour générer des dommages ADN *in vivo* au sein d'un organisme multicellulaire au stade embryonnaire, *Caenorhabditis elegans*.

Ces résultats ouvrent la voie vers des expériences plus fines sur la ligne de micro-irradiation ciblée du CENBG pour étudier les effets de l'interaction des rayonnements ionisants avec le vivant, aux échelles cellulaire et multicellulaire, *in vitro* et *in vivo*.

Mots-clés : Radiobiologie, Microfaisceaux d'ions, Détection des ions, Micro-irradiation ciblée, Vidéomicroscopie, Microdosimétrie, Dommages ADN radio-induits, HeLa, *Caenorhabditis elegans*

Title: *IN VITRO AND IN VIVO ION BEAM TARGETED MICRO-IRRADIATION FOR RADIOBIOLOGY*

Abstract: The main goal of radiobiology is to understand the effects of ionizing radiations on the living. These past decades, ion microbeams have shown to be important tools to study for example the effects of low dose exposure, or the bystander effect. Since 2003, the CENBG has been equipped with a system to perform targeted micro-irradiation of living samples. Recently, microbeams applications on this subject have diversified and the study of DNA repair mechanisms at the cellular and multicellular scales, *in vitro* and *in vivo*, has become possible thanks to important evolutions of fluorescence imaging techniques and cellular biology. To take into account these new approaches, the CENBG micro-irradiation beamline has been entirely redesigned and rebuilt to implement new features and to improve the existing ones. My PhD objectives were i) commissioning the facility, ii) characterizing the system on track etch detectors, and on living samples, iii) implementing protocols to perform targeted irradiations of living samples with a controlled delivered dose, at the cellular and multicellular scales, and to visualize the early consequences online, iv) modelling these irradiations to explain the biological results using the calculated physical data. The work of these past years has allowed us i) to measure the performances of our system: a beam spot size of about 2 μm and a targeting accuracy of $\pm 2 \mu\text{m}$, and to develop ion detection systems for an absolute delivered dose control, ii) to create highly localized radiation-induced DNA damages and to see online the recruitment of DNA repair proteins, iii) to apply these protocols to generate radiation-induced DNA damages *in vivo* inside a multicellular organism at the embryonic stage: *Caenorhabditis elegans*.

These results have opened up many perspectives on the study of the interaction between ionizing radiations and the living, at the cellular and multicellular scales, *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Radiobiology, Ion microbeams, Ion detection, Targeted micro-irradiation, Time-lapse imaging, Microdosimetry, Radiation-induced DNA damages, HeLa cells, *Caenorhabditis elegans*